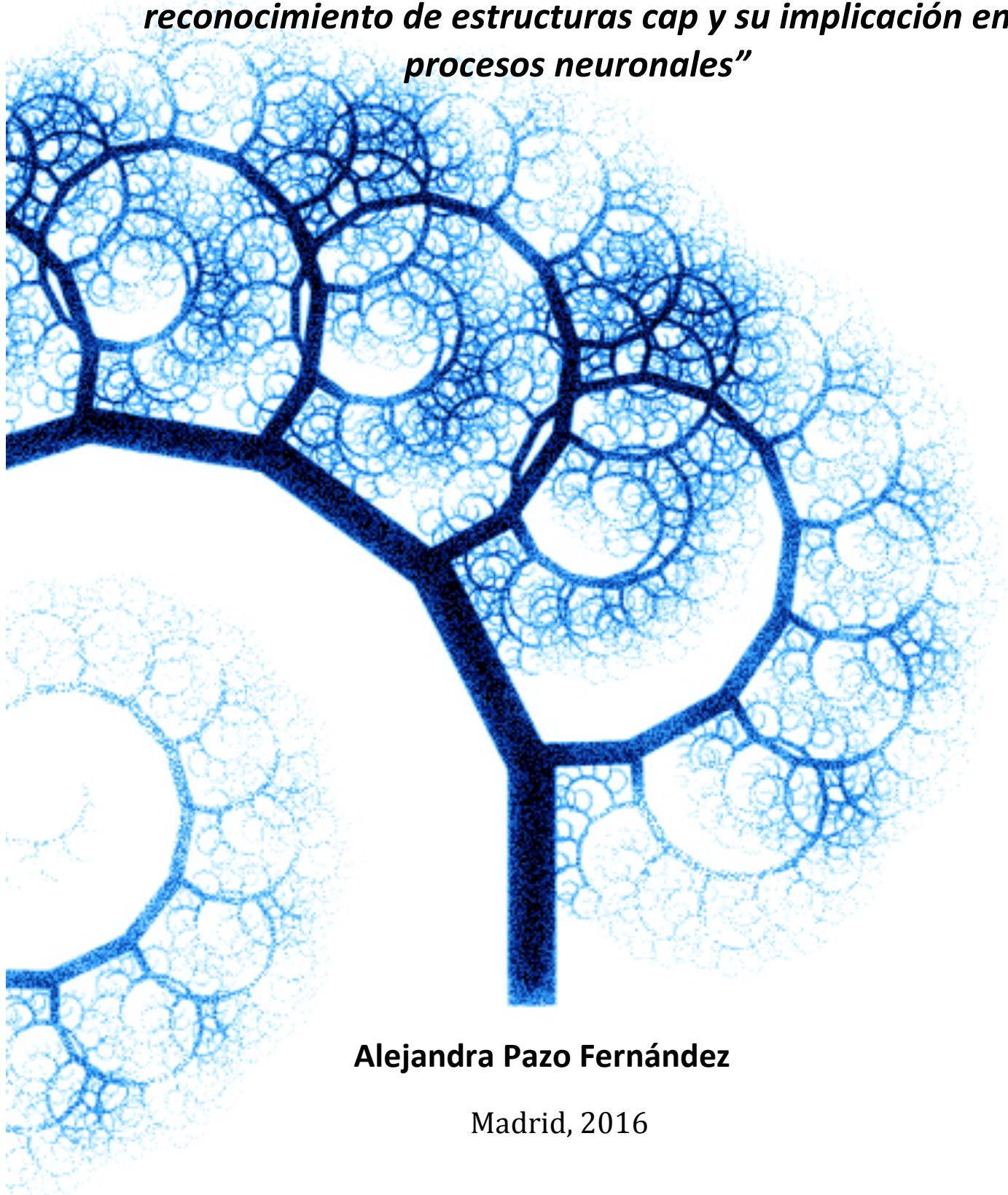


Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular y Celular

***“Funciones de hCLE en asociación con DDX1, HSPC117 y
FAM98B en la modulación de la traducción de proteínas, el
reconocimiento de estructuras cap y su implicación en
procesos neuronales”***



Alejandra Pazo Fernández

Madrid, 2016

Departamento de Biología Molecular y Celular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

***“Funciones de hCLE en asociación con DDX1, HSPC117 y
FAM98B en la modulación de la traducción de
proteínas, el reconocimiento de estructuras cap y su
implicación en procesos neuronales”***

Doctorando: Alejandra Pazo Fernández.
Licenciada en Biotecnología

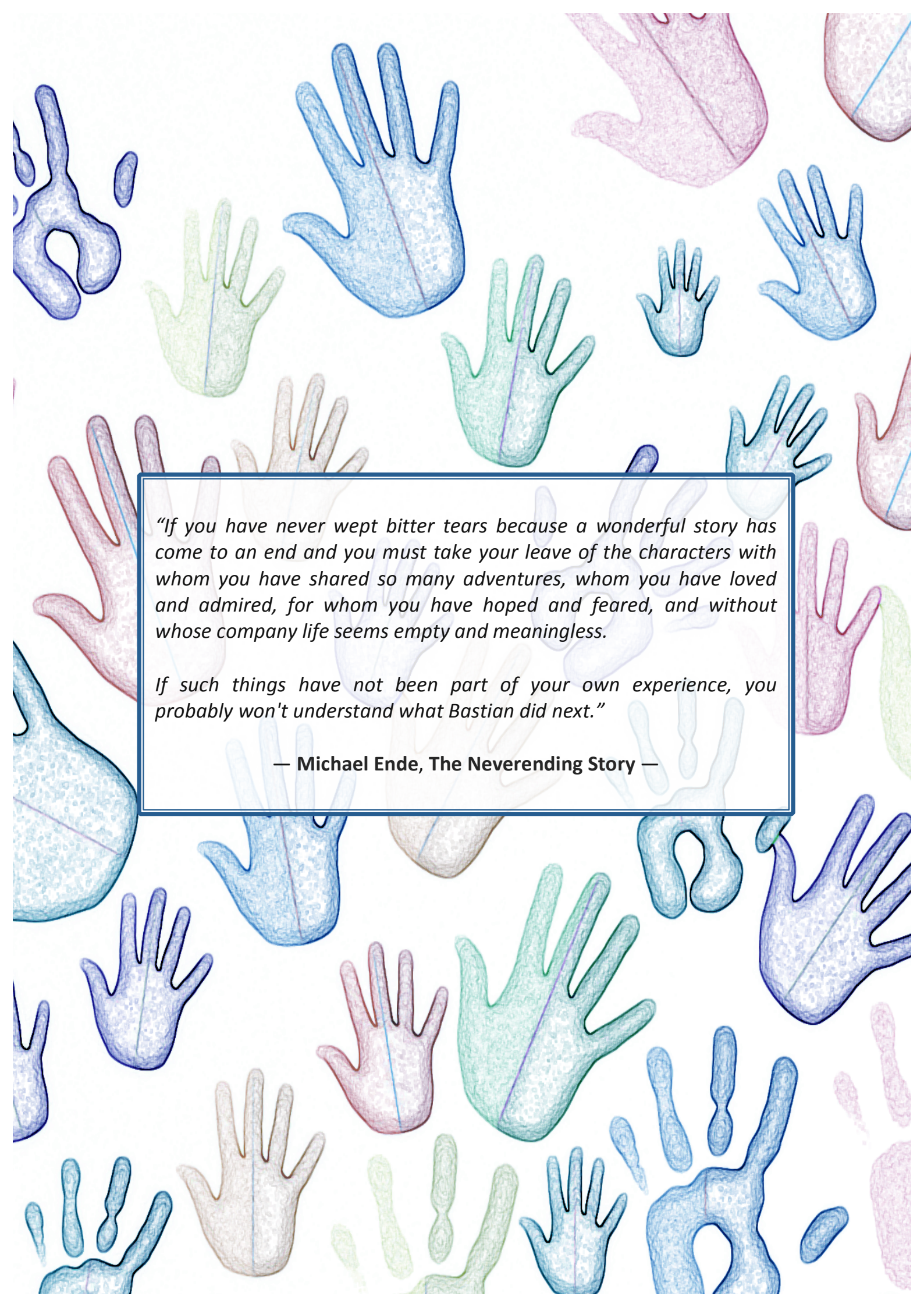
Directores: Dra. Amelia Nieto Martín
Dra. Alicia Pérez González

Lugar de Realización: Centro Nacional de Biotecnología
Campus de la Universidad Autónoma de
Madrid

A mis padres

A mi abuela

A Javi

The background of the entire page is a dense, repeating pattern of stylized hands. Each hand is drawn with a simple outline and filled with a textured, stippled effect. The hands are in various colors including shades of blue, green, pink, purple, and yellow. They are oriented in different directions, some palm up, some palm down, and some with fingers spread, creating a sense of movement and diversity.

"If you have never wept bitter tears because a wonderful story has come to an end and you must take your leave of the characters with whom you have shared so many adventures, whom you have loved and admired, for whom you have hoped and feared, and without whose company life seems empty and meaningless.

If such things have not been part of your own experience, you probably won't understand what Bastian did next."

— Michael Ende, *The Neverending Story* —



AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Es complicado resumir todas las cosas y a todas las personas a las que debería agradecer el haber llegado a este punto, pues la tesis no es solo el final de un periodo de 4 años en el que has sido un estudiante de doctorado, sino que es la culminación de toda una vida de estudio y formación a distintos niveles y en distintos ámbitos.

Aunque no es lo más común, voy a comenzar dando gracias a las personas de las que ha dependido prácticamente al 100% que haya llegado hasta aquí: a mis padres y a mi abuela. Dejando a un lado que sin vosotros no existiría... sin vuestro apoyo y vuestra ayuda nunca habría aprendido a ser constante en el estudio, a ser trabajadora y responsable. No habría tenido la oportunidad de estudiar una carrera, y aun habiéndola tenido, seguro que no habría podido sacar lo mejor de mí para seguir adelante en los malos momentos. Esto os lo debo a vosotros casi al 100% y nunca podré agradeceréoslo lo suficiente. Dentro de este grupo de personas esenciales, también tengo que dar las gracias a mi marido: me diste la estabilidad necesaria para mantener los pies sobre la tierra, me apoyaste sin rechistar en los momentos de estrés y de agobio, y siempre has estado ahí para darme la mano cuando lo he necesitado. No me imagino cómo habría sido mi vida de estudiante de doctorado sin ti... muchas gracias por todo.

Y como es común, continuaré ahora con el ámbito más profesional... aunque también ha supuesto durante este periodo mi segunda familia. Gracias a mi jefa, Amelia por haberme ayudado a centrar mis objetivos, a no desviarme con todas las cosas extremadamente interesantes que iba sacando de distintos hilillos de investigación. Gracias por haber sido tan comprensiva siempre y por haberme enseñado a ser un buen científico no solo a nivel técnico, sino también a nivel personal. Eres uno de los mejores ejemplos que se pueden tener a seguir y estoy segura de que me has dado una formación que va a influir en mí, para bien, el resto de mi carrera. Gracias también a mi codirectora de tesis, Alicia. Ali: tú me enseñaste todo lo que debía saber para empezar a rodar en el laboratorio, me enseñaste a querer a nuestra pequeña hCLE y a defenderla con todas las armas posibles. Eres una codirectora genial y una persona estupenda, me alegra montón que hayas estado conmigo en todos los pasitos que he ido dando a lo largo de la tesis.

Gracias al resto de mis compañeros del laboratorio, por haber respondido siempre a todas mis preguntas, por todos los buenos momentos que hemos pasado de charla-coloquio durante y entre los experimentos. Ha sido muy importante tener amigos en el laboratorio para que esta etapa de mi vida haya sido tan fantástica y ojalá allá donde vaya encuentre compis tan estupendos como vosotros (aunque ciertamente sois difícilísimos de superar!).

También tengo que agradecer especialmente a Juan Ortín y a todo su laboratorio el compañerismo durante estos años. Tener un laboratorio “hermano” de tanta calidad ha hecho, sin duda, que todo saliese a pedir de boca. De forma análoga, también agradezco la ayuda y consejo de Pablo Gastaminza y todo su equipo, ha sido muy divertido y enriquecedor contar con un ala de polaridad positiva en los seminarios de grupo. Habéis multiplicado, al menos por 2, la formación que he recibido.

Los laboratorios de Yukiko Goda, Margarita Díaz Guerra y Marta Nieto también habéis sido muy importantes para apoyarme en mis primeros pasitos en el ámbito neuronal, y no sé cómo habría sacado tantas cosas chulas sin vosotros. Recuerdo quedarme con la boca abierta siempre que empezaba a hablar con vosotros de neuronas. Muchísimas gracias por todo.

Gracias también a Ibo y a todo su laboratorio por haber compartido tanto conocimiento, ideas y motivación conmigo, especialmente en esos días que tocaba hincar los codos hasta tarde con incubaciones interminables... ¡qué de “buenos” momentos!

Y por último, gracias a toda la gente del CNB que me ha ayudado en distintos momentos cuando me he salido un poco de el ámbito de mi laboratorio. Es genial saber que siempre hay alguien dispuesto a ayudar en algún lugar del centro tan solo con escribir un correo pidiendo aquello que necesitas. Es algo que seguro no voy a encontrar fácilmente allá a donde vaya, y me parece muy digno de mencionar y agradecer de corazón. Nunca olvidaré a las personas con las que he coincidido a lo largo de estos años, porque no han hecho más que brindarme buenas experiencias, muestras de simpatía, solidaridad y compañerismo.

MUCHÍSIMAS GRACIAS!! Esta tesis es para vosotros! ☺

“You do not need to leave your room. Remain sitting at your table and listen. Do not even listen, simply wait, be quiet, still and solitary. The world will freely offer itself to you to be unmasked, it has no choice, it will roll in ecstasy at your feet”.

— Franz Kafka, The Zürau Aphorisms —



RESUMEN

RESUMEN

hCLE/C14orf166/CGI-99 es una proteína nuclear y citoplasmática que forma complejos multiproteicos. En ambos compartimentos se asocia con las proteínas DDX1, HSPC117 y FAM98B, y transporta RNAs que codifican mayoritariamente proteínas relacionadas con la traducción de RNAs y el metabolismo energético, proteínas de función neuronal, canales iónicos y proteínas de transporte vesicular. hCLE se mueve entre el núcleo y el citoplasma y su reentrada al núcleo es dependiente de transcripción activa, siendo esta dependencia compartida por DDX1, HSPC117 y FAM98B.

hCLE purificado une m7GTP, un análogo de la estructura 5' cap de los mRNAs, en células HEK293T, en células neuronales y en extractos de cerebro de rata. Esta unión se produce con mayor afinidad y especificidad que la del factor citoplasmático eIF4E, requerido para la iniciación de la traducción de los mRNAs. Además la unión de hCLE a m7GTP es modulada positivamente por DDX1-HSPC117-FAM98B.

El silenciamiento de hCLE reduce la acumulación de sus proteínas asociadas y la traducción de los mRNAs sin afectar su transporte o su estabilidad. El análisis de la función neuronal de hCLE muestra que está presente en sinapsis y enriquecida en sinaptosomas, localización no compartida con sus proteínas asociadas, lo que modula negativamente su capacidad para unirse al 5' cap en este compartimento subcelular.

En conjunto los datos sugieren que hCLE-DDX1-HSPC117-FAM98B están formando un complejo de movimiento núcleo-citoplasmático, transportando mRNAs bloqueados traduccionalmente hasta su destino final. En respuesta a señales específicas el complejo de hCLE se remodelaría perdiendo hCLE la capacidad de unión a estructuras cap, permitiendo la traducción de los mRNAs asociados requeridos y cooperando en los mecanismos locales de traducción.

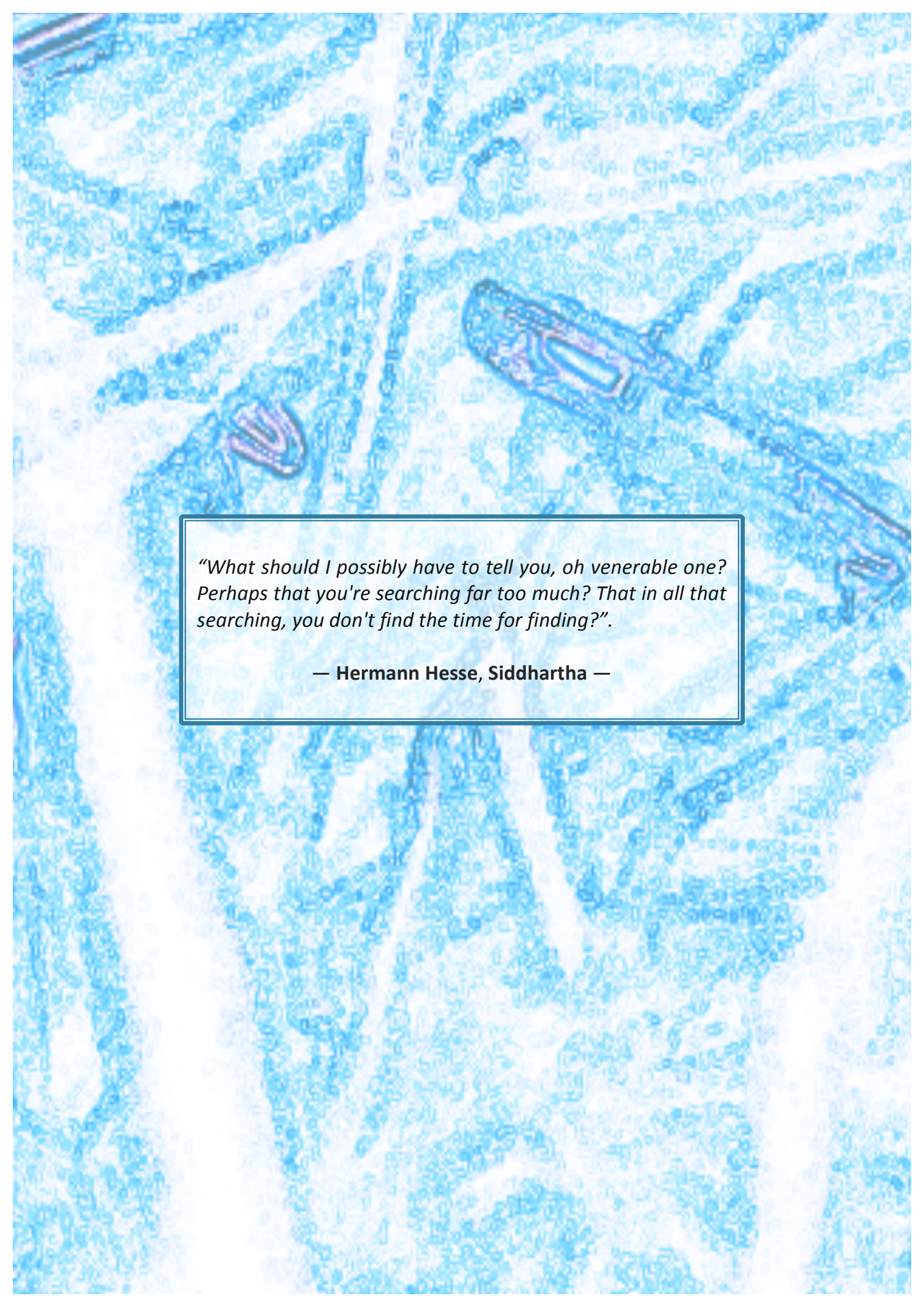
SUMMARY

hCLE/C14orf166/CGI-99 is a nuclear and cytoplasmic protein that forms multiprotein complexes. In both compartments it associates with DDX1, HSPC117 and FAM98B, and transports RNAs that mainly encode proteins related with RNA translation and energy metabolism, neuronal function, ion channels and vesicle transport. hCLE shuttles between nucleus and cytoplasm and the re-entry to the nucleus depends on active transcription, a behavior shared with its interactors DDX1, HSPC117 and FAM98B.

In HEK293T cells, neuronal primary cultures and brain tissues, endogenous hCLE binds m7GTP, a 5' cap RNA structure analog, with higher affinity and specificity than eIF4E's, a factor required for mRNA's translation initiation. Purified hCLE also binds m7GTP, and this binding capacity is positively modulated by DDX1-HSPC117-FAM98B.

hCLE's silencing decreases the accumulation of the associated proteins and inhibits overall mRNA translation, not affecting mRNA transport or stability. On the other hand, the analysis of hCLE's neuronal function shows that hCLE is present in synapses and enriched in synaptosomes, whereas the accompanied DDX1, HSPC117 and FAM98B proteins are absent. Consequently, synaptosomal hCLE loses the 5' cap binding activity in this cellular compartment.

Taking altogether, the data suggest that hCLE-DDX1-HSPC117-FAM98B are forming a shuttling complex that transports mRNAs in a translationally repressed way from the nucleus to their final destination in the cytoplasm. In response to specific signals, hCLE's complex remodeling could be triggered, losing hCLE its capacity to bind cap structures and thus, allowing the cap-dependent translation of cargo mRNAs in the place where they are required, cooperating with local translation mechanisms.

The background is a blue-toned photograph of a river. A small boat with a person inside is visible in the upper right. The river flows from the top left towards the bottom right. The banks are covered in dense vegetation. The overall mood is serene and contemplative.

*“What should I possibly have to tell you, oh venerable one?
Perhaps that you're searching far too much? That in all that
searching, you don't find the time for finding?”.*

— Hermann Hesse, Siddhartha —

A microscopic image of a cell, likely a eukaryotic cell, showing a large, prominent nucleus stained in a deep purple color. The nucleus contains a darker, more dense nucleolus. The surrounding cytoplasm is stained in a lighter blue color, showing various organelles and cellular structures. The cell is elongated and has a rough, irregular shape. The background is a light blue, textured surface.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	1
ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS.....	7
INTRODUCCIÓN	11
1. INTERACCIÓN VIRUS - HUÉSPED.....	13
1.1 Los virus y su dependencia celular:.....	13
1.2 hCLE y el virus de la gripe:.....	13
2. CICLO DE VIDA DE LOS mRNAs CELULARES.....	14
2.1. La vida del mRNA en el núcleo:.....	14
2.1.1 Inicio de la transcripción y elongación	14
2.1.2 Adición de la estructura 5' cap al mRNA	15
2.1.3 Ensamblaje (splicing).....	17
2.1.4 Poliadenilación	17
2.1.5 Terminación de la transcripción	17
2.2 Transporte del mRNA desde el núcleo al lugar de traducción	17
2.2.1 Salida del mRNA del núcleo.....	18
2.2.2 Transporte del mRNA en el citoplasma	19
2.3 La traducción del mRNA.....	20
2.3.1 Iniciación de la traducción.....	20
2.3.2 Elongación de la traducción	22
2.3.3 Terminación de la traducción	22
3. Traducción localizada.....	22
3.1 Mecanismos de regulación para la traducción localizada.....	22
3.2.1 Motivos reguladores en cis.....	22
3.2.2 Mecanismos reguladores en trans	23
3.3 Traducción localizada en neuronas.....	25
3.3.1 Importancia de la traducción localizada para las neuronas.....	26
3.4 Traducción localizada en procesos patológicos	27
4. Función de hCLE en la célula	28
4.1 Generalidades	28
4.2 Dominios predichos	28

4.3 hCLE y virus	29
4.4 hCLE y la célula	30
4.4.1 Relación de hCLE con el ciclo celular	30
4.4.2 Relación de hCLE con la transcripción de los mRNAs	30
4.4.3 Relación de hCLE con el procesamiento de los mRNAs	30
4.4.4 Presencia de hCLE en gránulos de transporte de RNA en neuronas.....	31
4.5 Importancia del estudio de hCLE en la célula	32
OBJETIVOS.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS	37
MATERIALES.....	39
1. Materiales Biológicos.....	39
1.1 Cultivos Primarios:	39
1.1.1 Células hipocámpales de rata	39
1.1.2 Células corticales de rata	39
1.2 Líneas Celulares:.....	39
1.2.1 Células HEK 293T:.....	39
1.3. Estirpes bacterianas:	39
1.3.1 DH5alfa:	39
1.4 Virus:	39
1.4.1 Vaccinia T7:	39
2. Otros materiales biológicos	39
2.1 Plásmidos:	39
2.1.1 Plásmidos para la sobreexpresión de hCLE:	39
2.2 Anticuerpos:.....	40
2.2.1 Anticuerpos primarios:.....	40
2.2.3 Anticuerpos secundarios:	41
MÉTODOS	41
1. Manipulación de ADN y clonajes.....	41
1.1 Obtención de plásmidos.	41
1.2 Diseño y generación de plásmidos lentivirales de silenciamiento.	41
2. Manipulación de cultivos celulares	42
2.2 Línea Celular HEK293T.	42
2.2.1 Mantenimiento de las línea:	42
2.2.2 Transfección:	42

2.2.3 Tratamiento con drogas:.....	42
2.2.4 Transfección-Infección con <i>Vaccinia T7</i> :.....	43
2.2.5 Obtención de extractos nucleares y citosólicos:.....	43
2.3 Células hipocámpales de rata	43
2.4 Células corticales de rata	44
2.5 Preparaciones de sinaptosomas.	44
3. Manipulación y análisis de RNA	45
3.1 Extracción de RNA de células eucariotas	45
3.2 Transcripción <i>in vitro</i>	45
3.3 Marcaje terminal de sondas de hibridación.....	45
3.3 Cromatografía Oligo-dT.....	45
3.4 Geles de Agarosa para RNA.....	46
3.5 Northern Blot	46
3.6 Dot-Blot	46
3.7 Caracterización de RNAs asociados a hCLE	47
3.7 Análisis de datos de secuenciación masiva.	47
4. Manipulación y análisis de proteína.....	47
4.4 Western Blot	47
4.2 Purificación secuencial mediante etiquetas <i>TAP</i>	48
4.3 Purificación mediante colas de Histidina	49
4.4 Cromatografías de exclusión por tamaño	49
4.5 Tinción de geles con nitrato de plata	50
4.6 Geles Nativos de Proteína.....	50
4.7 Inmunoprecipitación	50
4.8 Espectrometría de masas.....	51
4.8.1 Identificación de proteínas mediante análisis MALDI-TOF-TOF:.....	51
4.8.2 Preparación de las muestras para LC-MS/MS (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem).....	51
4.8.3 Identificación de proteínas mediante análisis LC-MS/MS	51
5. Técnicas de imagen.....	53
5.1 Inmunofluorescencias.....	53
5.2 Fotoactivación y seguimiento de proteína.....	53
6. Ensayos funcionales.....	54
6.1 Ensayos de unión a resinas de análogos de cap.....	54

6.2 Marcaje Metabólico	54
------------------------------	----

RESULTADOS57

1. <u>Presencia de hCLE en líneas celulares</u>	59
1.1 <i>hCLE forma dímeros resistentes a condiciones desnaturalizantes</i>	59
1.3 <i>El dímero de hCLE resistente a desnaturalización se genera a través de la zona de hélice superenrollada</i>	63
2. <u>Caracterización de los complejos de hCLE</u>	65
2.1 <i>hCLE interacciona con proteínas acompañantes comunes en el núcleo y en el citoplasma</i>	65
2.2 <i>Los acompañantes comunes en núcleo y citoplasma están presentes en complejos junto al hCLE endógeno, y sus interacciones dependen parcialmente de RNA</i>	66
2.3 <i>hCLE inmunoprecipita a los distintos miembros del complejo con distinto grado de eficiencia, aportando datos sobre la estructuración del complejo</i>	72
2.4 <i>hCLE es necesaria para mantener los niveles del complejo hCLE-DDX1-HSPC117-FAM98B</i>	73
3. <u>Caracterización funcional de los complejos de hCLE</u>	74
3.1 <i>hCLE es una proteína tipo shuttling</i>	75
3.2 <i>La actividad shuttling de hCLE depende de transcripción activa</i>	76
3.3 <i>Sus proteínas acompañantes poseen un comportamiento análogo al de hCLE</i>	78
3.4 <i>Los complejos de hCLE unen a mRNAs de proteínas ribosomales y proteínas del metabolismo energético</i>	79
3.6 <i>El complejo de hCLE modula positivamente la traducción de mRNAs</i>	82
3.7 <i>El complejo de hCLE afecta directamente a la traducibilidad de los mRNAs, sin afectar a su transporte ni a su estabilidad</i>	84
4. <i>hCLE tiene capacidad de unir estructuras CAP</i>	88
4.1 <i>hCLE endógeno une análogos del 5' cap junto a sus acompañantes</i>	88
4.2 <i>hCLE purificada continua uniendo análogos de 5' cap</i>	89
4.3 <i>El complejo de hCLE une análogos de 5' cap con mayor afinidad y especificidad que eIF4E</i> ...	91
4.4 <i>hCLE tiene más afinidad por mononucleótidos metilados que por dinucleótidos metilados</i> ...	93
4.5 <i>Los complejos de alto peso molecular de los que forma parte hCLE son esenciales para la unión a las resinas de análogos de 5'cap</i>	93
5. <u>Estudio del papel de hCLE en Neuronas</u>	95
5.1 <i>El complejo de hCLE está conservado en neuronas y conserva su capacidad para unirse a resinas de análogos de 5' cap</i>	96
5.2 <i>El patrón de expresión y localización de hCLE sufre cambios durante el desarrollo neuronal</i> .	97
5.3 <i>hCLE está enriquecido en sinaptosomas, pero no los otros componentes del complejo</i>	99
5.5 <i>El hCLE presente en sinaptosomas no presenta capacidad de unión a 5' cap</i>	102

DISCUSIÓN	106
Función endógena de hCLE	108
Posible función de hCLE en neuronas	117
CONCLUSIONES	124
CONCLUSSIONS	126
REFERENCIAS BLIBLIOGRÁFICAS:	128
ANEXOS:.....	140
Artículos producto del trabajo durante la tesis:	140
1. <i>hCLE/C14orf166 is a translational activator present in neuronal RNA-transporting granules that binds cap structures differentially in distinct neuronal compartments (en revisión).</i>	140
2. hCLE/C14orf166 associates with DDX1-HSPC117-FAM98B in a novel transcription-dependent shuttling RNA-transporting complex.....	140
3. hCLE/C14orf166, a cellular protein required for viral replication, is incorporated into influenza virus particles.	140
4. Influenza Virus and Chromatin: Role of the CHD1 Chromatin Remodeler in the Virus Life Cycle.	140

ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS

Arc: Activity-Regulated Cytoskeletal.

ASF/SF2: Alternative Splicing Factor 1 / pre-mRNA Splicing Factor 2

ATP: Adenosine Tri-Phosphate (Trifosfato de Adenosina).

BSA: Bovine Serum Albumin, (Albúmina Sérica Bovina).

CamKII: Ca(2+)/calmodulin-dependent Kinase II

Capping: proceso de síntesis de la estructura CAP de los mRNAs.

CBB: Calmodulin Binding Buffer; Tampón de Unión a resina de Calmodulina).

CBD: Calmodulin Binding Domain (dominio de unión a calmodulina).

CFI y CFII: Cleavage Factors I and II (Factores de Corte I y II).

CMV: CitoMegaloVirus.

CPEB: Cytoplasmic Poliadenilation Element Binding protein, (proteína citoplasmática de union al elemento de poliadenilación).

CPM: cuentas por minuto.

CPSF: Cleavage/Polyadenilation Specificity Factor (factor de especificidad para el corte y la poliadenilación).

CRMs: Cis-Regulatory Motifs (motivos reguladores en *cis*).

CstF: Cleavage stimulation Factor (factor de estimulación del corte).

DAPI: 4 '6-diamino-2-fenilindol.

DNA: DeoxiRibonucleic Acid (ácido desoxiribonucleico).

DRB: 5,6-Dichloro-1- β -D-Ribofuranosyl-Benzimidazole. Droga que previene las fosforilaciones que activan el dominio C terminal de la RNA Polimerasa II celular inhibiendo la elongación de la transcripción de mRNAs.

DTT: agente reductor DiTioTreitol.

eIFs: eukariotic Initiation Factors (factores de iniciación eucariotas).

EJC: Exon Junction Complex (complejo de ensamblado de exones).

eRFs: eukariotic Release Factors (factores de liberación eucariotas).

FDR: False Discovery Rate (tasa de identificación de falsos positivos).

GFP: Green Fluorescent Protein (proteína verde fluorescente).

hCLE/CGI99: proteína celular objeto de estudio en esta tesis.

HCV: Hepatitis C Virus (Virus de la Hepatitis C)

HIV: Human Immunodeficiency Virus (Virus de la Inmunodeficiencia Humana)

IBV: Infectious Bronchitis Virus (Virus de la Bronquitis Infecciosa).

IF: Immunofluorescencia.

IgG: Immunoglobulina G.

IPP: Immunoprecipitación.

MMTS: Metil Metano TioSulfato.

mRNA: messenger RNA (RNA mensajero).

nCBC: nuclear Cap Binding Complex (complejo nuclear de unión a CAP).

NES: Nuclear Export Signals (señales de salida del núcleo).

PA: Proteína Ácida, subunidad proteolítica de la Polimerasa del virus de la gripe.

nPABP: nuclear PolyAdenosine Binding Protein (proteína nuclear de unión a poliadeninas)

NPCs: Nuclear Pore Complexes (Complejos de Poro Nuclear).

PAGE-SDS: PolyAcrylamide Gel Electrophoresis with SDS (Geles de Poliacrilamida desnaturalizantes).

PAGFP: PhotoActivable Green Fluorescent Protein (proteína verde fluorescente fotoactivable).

PAP: PoliAdenilato Polimerasa.

PB1: Proteína Básica 1, subunidad catalítica de la Polimerasa del virus de la gripe.

PB2: Proteína Básica 2, subunidad de reconocimiento de la estructura de CAP de la RNA Polimerasa del virus de la gripe.

PPM: partes por millón.

PVDF: Polyvinylidene DiFluoride, (polidifluoruro de vinilideno).

RBP: RNA-Binding Protein (proteína de unión a RNA).

RISC: RNA-induced silencing complex (complejo de silenciamiento inducido por RNA)

RNA: RiboNucleic Acid (ácido ribonucleico).

RNAP II: RNA Polimerasa II celular.

RNP: RiboNucleoProteína.

RPM: Revoluciones Por Minuto.

hnRNPs: heterogeneous nuclear RiboNucleoProteins. Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares, encargadas de marcar los pre-mRNAs para que no sean transportados al núcleo en estado inmaduro.

Shuttling: capacidad de ciertas proteínas de moverse del núcleo al citoplasma y del citoplasma al núcleo de la célula.

shRNA: small hairpin RNA; horquilla pequeña de RNA.

snRNAs: small nuclear RNAs. (RNAs nucleares pequeños)

snoRNAs: small nucleolar RNAs (RNAs nucleolares pequeños).

snRNPs: small nuclear RiboNucleoProteins

ssDNA: single stranded DNA (DNA de cadena sencilla).

Surveillance: control de calidad del mRNA durante la transcripción.

Splicing: procesamiento del pre-mRNA por el que se eliminan secuencias intrónicas por corte y ensamblaje.

TCEP: Tris (2-Carboxi-Ethil) Phosphine.

TEAB: Buffer de Trimetil Amonio Bicarbonato.

TFE: TriFluoroEtanol.

TFs: Transcription Factors (Factores de Transcripción).

TIM: Translocase of the Innner Membrane (translocasa de la membrana interna).

TOM: Translocase of the Outer Membrane (translocasa de la membrana externa).

TREX: Transcription Export Factor.

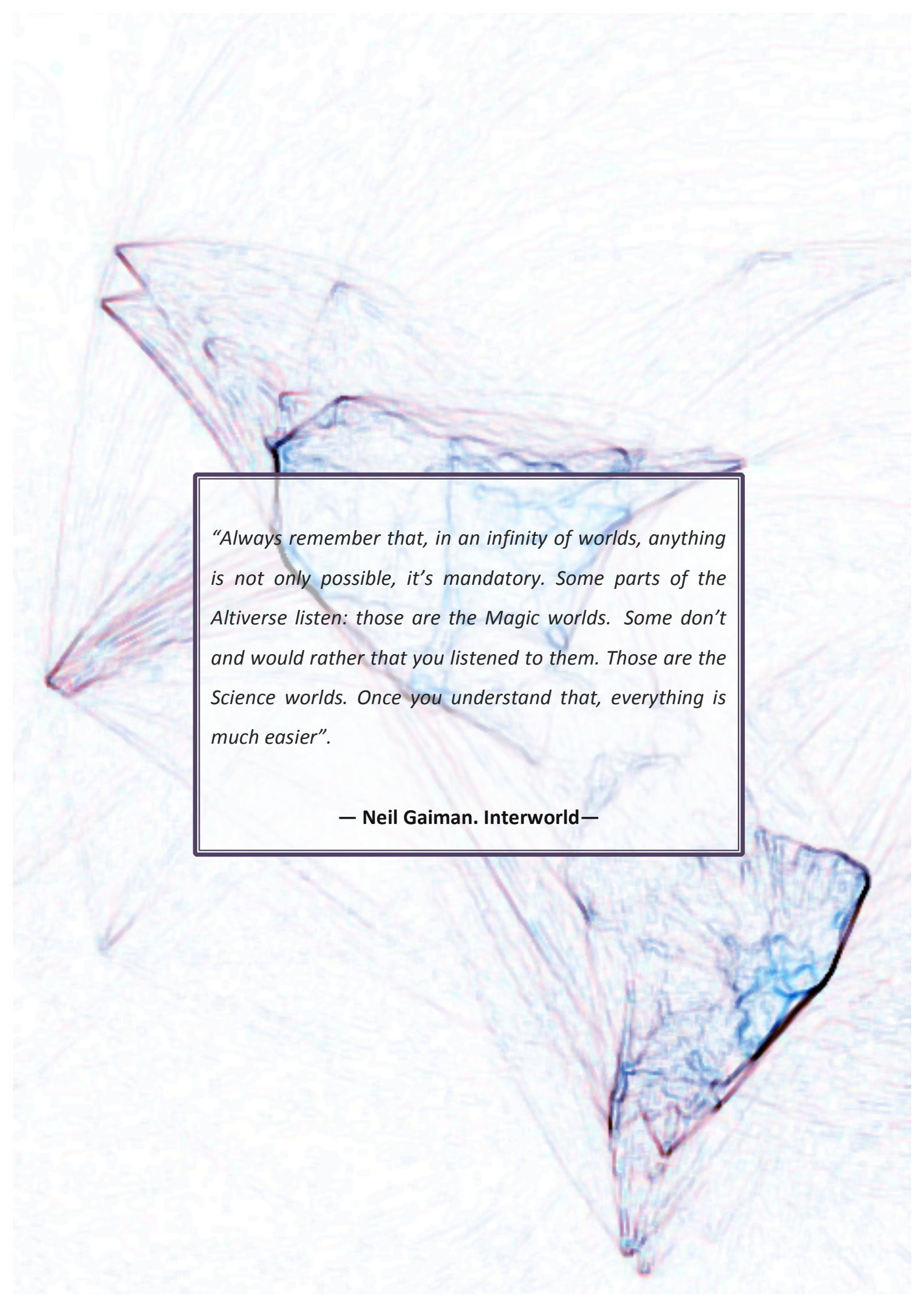
TX100: Detergente Tritón X 100

UPR: Unfolded Protein Response

Upstream: río arriba.

UTRs: UnTranslated Regions, regiones no codificantes ubicadas en los extremos 3' y 5' de los mRNAs, que contienen gran cantidad de elementos reguladores.

WB: Western Blot

The background of the entire image is a complex, abstract pattern of thin, overlapping lines in shades of blue and red. These lines form a series of interconnected, angular shapes that resemble a stylized, multi-layered star or a series of overlapping triangles. The lines are most concentrated in the center and bottom right, creating a sense of depth and movement. The overall effect is a dreamlike, ethereal space that complements the quote about alternate worlds.

“Always remember that, in an infinity of worlds, anything is not only possible, it’s mandatory. Some parts of the Altiverse listen: those are the Magic worlds. Some don’t and would rather that you listened to them. Those are the Science worlds. Once you understand that, everything is much easier”.

— Neil Gaiman. Interworld—

The background of the slide is a complex, abstract pattern of fine, overlapping lines in shades of blue and red. These lines form a dense, web-like structure that fills the entire frame. In the center of the slide, there is a white rectangular box with a thin black border. Inside this box, the word "INTRODUCCIÓN" is written in a bold, dark blue, sans-serif font. The text is centered both horizontally and vertically within the box.

INTRODUCCIÓN

1. INTERACCIÓN VIRUS - HUÉSPED

1.1 Los virus y su dependencia celular:

Los virus son agentes infecciosos que solo pueden multiplicarse cuando se encuentran en el interior de las células de distintos organismos. Su simplicidad genética hace que carezcan de los componentes necesarios para completar su ciclo vital de manera independiente.

Generalmente, todos los virus poseen mecanismos propios para replicar su genoma, pero carecen de la maquinaria necesaria para la traducción de su genoma a proteínas. Para este proceso se han adaptado para secuestrar la maquinaria traduccional de la célula hospedadora, y usarla en beneficio propio. Para poder utilizar la maquinaria celular, los virus han desarrollado un complejo sistema de interacciones con factores celulares que pertenecen a grupos funcionales de distintas categorías.

El estudio de los factores celulares asociados a la infección viral permite, no solo ahondar en el conocimiento del ciclo viral, respuesta inmune asociada, etc., sino también encontrar posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de las infecciones virales y caracterizar nuevas proteínas celulares que normalmente son relevantes para el ciclo celular propiamente

dicho. Por estos motivos la identificación y caracterización de los factores del huésped relevantes para la infección viral, así como el proceso viral en el que intervienen, es un área de estudio de gran interés, que aporta información valiosa tanto en el área de la virología como en el área de la biología molecular y celular.

1.2 hCLE y el virus de la gripe:

Analizando interacciones entre las proteínas celulares y la polimerasa del virus de la gripe mediante un análisis de doble híbrido, se identificaron una serie de proteínas de naturaleza desconocida, entre las que se encontraba la proteína celular hCLE. La polimerasa del virus de la gripe es una polimerasa de RNA dependiente de RNA que consta de tres subunidades: PA, PB1 y PB2. PB1 es la polimerasa propiamente dicha, PB2 es una proteína de unión a la estructura 5'cap de los mRNAs, y PA tiene actividad endonucleasa, para escindir los cap-oligos de los mRNAs endógenos y utilizarlos como cebadores de los mRNAs virales (Fodor 2013, Rodriguez-Frandsen, Alfonso et al. 2015). El ensayo de doble híbrido realizado inicialmente en el laboratorio, indicó que hCLE interaccionaba con la subunidad PA de la polimerasa viral (Huarte, Sanz-Ezquerro et al. 2001). Posteriores estudios mostraron que hCLE no solo se asocia a la subunidad PA, sino también a todo el complejo de la polimerasa viral (Rodriguez, Perez-Gonzalez et al. 2011).

Los estudios realizados por nuestro grupo acerca de la función de hCLE en el contexto de la infección han mostrado que hCLE es un modulador positivo de la transcripción, replicación, y multiplicación virales (Rodríguez, Perez-Gonzalez et al. 2011), que se sobreexpresa durante la infección y se encuentra asociada a las RNPs de gripe. Estas RNPs virales viajan del núcleo al citoplasma de la célula infectada para permitir el paso de la fase de ciclo nuclear a la fase citoplasmática. Además hCLE se incorpora en los viriones que se expulsan a través de la membrana celular para continuar la infección (Rodríguez-Frandsen, de Lucas et al. 2016). Todos estos datos apuntan a un papel de hCLE en el metabolismo de los RNAs virales, que probablemente esté vinculado a un papel endógeno en el metabolismo de los RNAs celulares, destacando especialmente los mRNAs.

2. CICLO DE VIDA DE LOS mRNAs CELULARES

La expresión de proteínas en la célula es un proceso estrictamente regulado. Desde el momento en que la cromatina es modificada para iniciar la transcripción de los genes, hasta que el mRNA resultante es degradado en el citoplasma tras haber cumplido con su función, múltiples agentes toman partido para controlar los procesos intermedios y que la expresión de proteínas se realice de la forma más eficiente posible.

El mal funcionamiento de estos sistemas da lugar a procesos celulares patológicos. Por esta razón, comprender los mecanismos moleculares efectores y reguladores del metabolismo del RNA ha sido desde siempre uno de los objetivos principales de la biología molecular y en los últimos años, las nuevas técnicas de proteómica y secuenciación masiva han permitido profundizar en el conocimiento de este área.

2.1. La vida del mRNA en el núcleo:

2.1.1 Inicio de la transcripción y elongación

La transcripción es el primer paso de la expresión genética, y consiste en la síntesis de un RNA a partir de su molde de DNA. Nos vamos a centrar en la síntesis de mRNAs, ya que constituyen los moldes que dan origen a las distintas proteínas, necesarias para realizar todos los procesos celulares.

La transcripción de mRNAs es una tarea inmensamente compleja y altamente regulada, que requiere gran número de factores proteicos. Se puede dividir en tres pasos o fases, que se conocen como: iniciación de la transcripción, elongación y terminación. Aunque cada etapa parece diferente e independiente de las demás, la maquinaria implicada en cada una de ellas es común, siendo la RNA Polimerasa II celular (RNAP II) el elemento integrador de todas ellas. Además, la RNAP II también acopla el proceso de transcripción a diversos mecanismos de “control de calidad” o

surveillance del mRNA y exportación del mRNA al citoplasma.

La iniciación de la transcripción comienza con la unión de activadores transcripcionales a la región río arriba (*upstream*) del promotor básico del gen a transcribir. Este suceso desencadena el reclutamiento de complejos adaptadores, que a su vez facilitarán la formación del complejo de inicio de la transcripción. Este complejo está formado por las diferentes subunidades de la RNAPII y un gran número de factores de transcripción (TFs) (Orphanides, Lagrange et al. 1996, Reines, Conaway et al. 1996). Una vez que la RNAPII se encuentra en la posición adecuada, la fosforilación múltiple de su dominio carboxi-terminal (CTD) provoca un cambio en los componentes del complejo para proceder a la elongación del transcrito (Goodrich and Tjian 1994).

La elongación de la transcripción es una etapa dinámica y altamente regulada, que coordina y acopla distintos procesos necesarios para la maduración del mRNA. Un mRNA inmaduro o pre-mRNA contiene regiones no codificantes en los extremos 5' y 3', denominadas 5'UTR y 3'UTR (*untranslated regions*); regiones no codificantes en la región traducible (intrones); y regiones codificantes que se traducen a proteína (exones).

La maduración del mRNA implica la adición de estructuras moleculares concretas en la regiones 5' UTR (*capping*) y 3' (poliadenilación), la eliminación de intrones y

la selección de determinados exones (procesamiento y ensamblaje o *splicing*). La elongación también coordina otros procesos tales como el “control de calidad” del RNA y su exportación al citoplasma. Todo ello será explicado con más detalle a continuación.

2.1.2 Adición de la estructura 5' cap al mRNA

Cuando el pre-mRNA alcanza una longitud de 18 nucleótidos se hace accesible a la maquinaria de procesamiento (Chung, Craighead et al. 2003, Kettenberger, Armache et al. 2003). Cuando llega a 22 - 30 nucleótidos se añade a su extremo 5'UTR la estructura cap (Coppola, Field et al. 1983), formada por la 7-metil-guanosina y el primer nucleótido del mRNA unidos por un puente 5'-5' trifosfato, formando el m⁷GTP (Haegeman and Fiers 1978). A esta estructura se une el complejo nuclear de unión a cap (nCBC), formado por un heterodímero de las proteínas CBP20 y CBP80 (Izaurralde, Lewis et al. 1994). Esta estructura protege al pre-mRNA de la acción de las exonucleasas 5'-3' (Coutts, Krowczynska et al. 1993, Hsu and Stevens 1993) y por su interacción con nCBC, es importante en los procesos de *splicing* (Konarska, Padgett et al. 1984, Kramer, Keller et al. 1984, Izaurralde, Lewis et al. 1994), poliadenilación (Bienroth, Keller et al. 1993) y transporte del mRNA al citoplasma (Hamm and Mattaj 1990, Izaurralde, Stepinski et al. 1992).

En el citoplasma, la estructura cap es la responsable de reclutar la maquinaria

traduccional por interacción con el factor eIF4E, de lo que se hablará con más detalle en apartados posteriores. El cap está implicado en estrictos procesos de regulación destinados a modular la homeostasis celular mediante el control de la traducción de proteínas a distintos niveles. Debido a la estricta regulación a la que están sometidos los procesos relacionados con el cap, existen descritas muy pocas proteínas, a parte de CBP80-CB20 y eIF4E, capaces de reconocer dicha estructura. Esto es probablemente debido a que cualquier factor celular con afinidad por el cap tanto en el núcleo como en el citoplasma, supondría un competidor de los factores antes mencionados y por ende, de los procesos en los que éstos son requeridos. Respecto a proteínas endógenas de unión a cap, hay estudios que muestran que Ago2, Gemin5 y el complejo NCBP1-NCBP3 tienen actividad de unión a cap. Ago2 está implicada en el sistema de silenciamiento basado en el complejo miRISC, y varios estudios mostraron que tenía capacidad de interactuar con las estructuras cap de los mRNAs por medio de su dominio central MID (Kiriakidou, Tan et al. 2007, Boland, Tritschler et al. 2010). Sin embargo, estudios posteriores han mostrado resultados contradictorios que apoyan que dicha interacción no es específica (Frank, Fabian et al. 2011). Gemin5 es el componente mayoritario del complejo de supervivencia de las motoneuronas (SMN), implicado en procesos de *splicing* de snRNPs y en el metabolismo y transporte de otros tipos de

RNPs. Gemin5 es una proteína de unión a cap que, aunque interactúa con eIF4E, posee capacidad autónoma de unión a cap (Bradrick and Gromeier 2009). Se cree que Gemin5 podría jugar un papel marcando en *cis* mRNAs específicos para su silenciamiento por miRNAs. Sin embargo su afinidad por el cap es inferior a la de eIF4E, y estudios de traducción *in vitro* no han mostrado que su presencia reduzca específicamente la traducción cap-dependiente, por lo que no parece ser un competidor para la iniciación de la traducción vía eIF4E. Por último, recientemente se ha identificado un nuevo complejo núcleo-citoplasmático, NCBP1-NCBP3, cuyo componente NCBP3 es capaz de unir cap y juega un papel muy importante para la salida de los mRNAs poliadenilados del núcleo al citoplasma en condiciones de estrés (Gebhardt, Habjan et al. 2015).

A parte de las proteínas celulares antes mencionadas, también existen algunas proteínas virales con capacidad de unión a estructuras cap. Una de ellas es la proteína VP39 del virus vaccinia (Hodel, Gershon et al. 1998), que actúa en el extremo 5' del mRNA como una metiltransferasa específica de cap, y en el extremo 3' de mRNA en procesos de elongación de la cola de poliA. Por último, también tiene actividad de unión a cap la proteína PB2 del complejo de la polimerasa del virus de la gripe. PB2 reconoce y une cap-mRNAs celulares y ayuda a reclutar el complejo de polimerasa viral a los mismos. Este proceso desencadena el proceso del robo del cap de los mRNAs celulares para

emplearos como iniciadores para la síntesis de mRNAs virales, asegurando su correcta traducción por la maquinaria celular (Guilligay, Tarendeau et al. 2008).

2.1.3 Ensamblaje (*splicing*)

El ensamblaje de los pre-mRNAs tiene lugar en un complejo de macromoléculas denominado ensamblador, comúnmente conocido por su nombre derivado del inglés *spliceosoma*. El *spliceosoma* está compuesto por snRNPs y otras proteínas tales como proteínas ricas en Serinas y Prolinas (Chen, Yu et al. 2002), Helicasas dependientes de ATP (Jankowsky 2011) o shRNPs (Moore and Sharp 1993, Kramer 1996, Manley and Tacke 1996) y distintos RNAs no codificantes como los snRNAs U1 y U6 (Raker, Plessel et al. 1996). El proceso de ensamblaje permite la delección de los intrones y determinados exones del pre-mRNA, dando lugar a diferentes isoformas de una proteína.

2.1.4 Poliadenilación

Tras la síntesis del pre-mRNA se añade una cola de poli-adeninas en el extremo 3' del RNA. Para ello, en un primer paso se escinde el extremo 3' del pre-mRNA por la acción de endonucleasas, y a continuación se añaden las poli-Adeninas al mismo extremo del pre-mRNA cortado. Entonces la proteína nuclear de unión a PoliA (nPABP) se une a la cola recién sintetizada protegiéndola de enzimas de deasilación y regulando su tamaño (Sachs and Deardorff

1992, Bienroth, Keller et al. 1993). La cola de PoliA, a parte de estabilizar al mRNA, modula el inicio de la traducción y sirve para controlar los niveles de expresión de ciertas proteínas en el citoplasma, en procesos denominados de poliadenilación citoplasmática, que desarrollaremos con más detalle en el apartado 3.2.2. Los únicos mRNAs celulares que no poseen una cola de PoliA son los mensajeros de las histonas del DNA (Gilmartin 2005).

2.1.5 Terminación de la transcripción

Se trata de un proceso distinto al corte y la poliadenilación, e implica la liberación del transcrito y de la RNAP II del molde de DNA. La regulación de la terminación, mediante la inducción de una terminación temprana, previene o limita de forma muy efectiva la expresión de ciertos genes y regula la actividad celular.

2.2 Transporte del mRNA desde el núcleo al lugar de traducción

Muchas de las proteínas importantes para el procesamiento post-transcripcional del mRNA están implicadas en su transporte al citoplasma. El mRNA ya maduro viaja normalmente en forma de mRNPs que contienen proteínas de distintas categorías. Parte de ellas se encargan de interaccionar con el poro nuclear para ser transportadas al citoplasma, otras están encargadas de proteger al mRNA y reclutar maquinaria traduccional. En ciertas ocasiones, estas

proteínas bloquean la traducción a la espera de determinadas señales celulares, para permitir mecanismos de traducción localizada.

2.2.1 Salida del mRNA del núcleo

La salida del mRNA del núcleo es un paso crucial en la regulación de la expresión genética, actuando de intermediario entre la transcripción nuclear y la traducción citoplasmática. Inicialmente se creía que la salida del mRNA del núcleo al citoplasma era un paso constitutivo del ciclo de vida de todos los mRNAs, pero en los últimos años se ha visto que en algunos casos puede ser altamente selectivo, priorizando unos mRNAs sobre otros.

Normalmente los mRNAs maduros, en forma de mRNPs, salen del núcleo a través de los complejos de poro nuclear (NPCs). Sin embargo, a partir de cierto tamaño de mRNPs (normalmente en función del tamaño del mRNA) es necesario emplear procesos de transporte alternativos a los NPCs, que se basan en *budding* o gemación de la envuelta nuclear, los cuales todavía no se comprenden en su totalidad.

El primer paso consiste en la formación de mRNPs competentes para la salida nuclear. Este proceso tiene lugar en compartimentos nucleares especializados denominados *speckles* nucleares, donde se encuentran factores de ensamblaje o *splicing*, componentes del TREX (*Transcription Export Factor complex*) y mRNAs ya poliadenilados

(Huang and Spector 1991). Se ha visto que parte de las proteínas relevantes para estos procesos (componentes del TREX) son reclutadas por el extremo 5' de mRNA durante el *splicing*, en una región muy próxima a la estructura 5' cap, mediante una interacción entre la proteína Aly y la subunidad de 80 kDa del nCBC (Cheng, Dufu et al. 2006). Otras de las proteínas componentes de las mRNPs son reclutadas específicamente debido a elementos de la secuencia de los mRNAs, generalmente en la zona 3' UTR. Esto hace que existan composiciones especiales de mRNPs asociadas a mRNA cargos particulares. A continuación, estas mRNPs competentes deben ser transportadas a la periferia del núcleo, donde luego interaccionarán con los NPCs para translocarse al citoplasma. El transporte desde los *speckles* nucleares a los NPCs es un paso muy limitante para la salida de los mRNAs al citoplasma celular, pues puede tardar varios minutos, a diferencia del paso a través de los NPCs, que es comparativamente rápido (menos de 500 milisegundos) (Oeffinger and Zenklusen 2012). Aunque todas las mRNPs competentes interaccionan con el poro nuclear, tan solo el 15-36% de los eventos de translocación son realmente efectivos liberando las mRNPs al citoplasma (Siebrasse, Kaminski et al. 2012). Se cree que esto es debido a mecanismos de regulación de determinadas interacciones entre ciertos componentes de las mRNPs y las proteínas del poro nuclear, indicando que

se trata de un proceso altamente regulado (Grunwald and Singer 2010).

2.2.2 Transporte del mRNA en el citoplasma

Una vez las mRNPs han salido al citoplasma, se producen importantes cambios en sus componentes. Proteínas específicamente nucleares como nCBC o nPABP son substituídas por sus equivalentes citoplasmáticos, protegiendo al mRNA y preparándolo para interactuar con la maquinaria ribosomal para su traducción. Las mRNPs viajan en estado silente por el citoplasma hasta que son integradas en los polisomas para ser traducidas. Generalmente este proceso tiene lugar de forma más o menos rápida debido a la gran cantidad de ribosomas que se encuentran en las inmediaciones del núcleo celular. Sin embargo, durante esta etapa de transporte citoplasmático, el mRNA, aunque se encuentra protegido, está expuesto a la gran cantidad de procesos que tienen lugar en el citoplasma, y es susceptible de abundantes mecanismos de regulación.

En muchos casos, las mRNPs se juntan formando grandes estructuras citoplasmáticas, carentes de membrana y visibles al microscopio, que se denominan gránulos de mRNPs o gránulos de mRNA, muy relevantes funcionalmente para diversos procesos relacionados con el metabolismo de los mRNAs. Atendiendo a su contexto celular, su función asociada y la presencia de

determinados marcadores proteicos, se pueden clasificar en distintos tipos:

Gránulos de células germinales

Son complejos de mRNPs que contienen mRNAs maternos traduccionalmente reprimidos, presentes en células germinales e implicados en almacenamiento y localización de mRNAs en procesos especialmente importantes para el desarrollo embrionario. Su ausencia o acumulación en determinados polos celulares da lugar a asimetrías en el desarrollo (Voronina, Seydoux et al. 2011).

Gránulos de transporte

Son complejos de mRNPs que viajan en asociación al citoesqueleto celular transportando mRNAs traduccionalmente inactivos a fin de inducir su traducción en el compartimento celular adecuado en respuesta a señales concretas. Los gránulos de transporte son especialmente importantes en el contexto neuronal, en procesos de desarrollo de los conos de crecimiento y de las sinapsis. A pesar de que se encuentran transcripcionalmente inactivos, se ha visto que muchos de ellos transportan ribosomas (Kiebler and Bassell 2006). En los últimos años distintos análisis de secuenciación masiva realizados en levaduras han mostrado que este tipo de gránulos muy posiblemente llevan a cabo procesos de traducción localizada en distintos orgánulos celulares, destacando las inmediaciones de la membrana mitocondrial (Marc, Margeot et al. 2002) y los peroxisomas (Zipor, Haim-Vilmsky et al. 2009).

Processing Bodies

Son complejos de mRNPs altamente dinámicos, presentes en prácticamente todos los tipos celulares de modo permanente, salvo durante la mitosis. Se caracterizan por estar especialmente enriquecidos en proteínas implicadas en degradación del mRNA (Jain and Parker 2013).

Gránulos de estrés

Son un tipo de gránulos que se forman en condiciones de estrés tales como cambios bruscos de temperatura, incidencia de luz ultravioleta, estrés oxidativo e hipoxia, entre otras. Contienen numerosos factores de iniciación de la traducción, incluyendo subunidades pequeñas del ribosoma, y se cree que funcionan a modo de centros de clasificación de mRNAs, donde se mantienen reprimidos hasta que las condiciones vuelvan a ser beneficiosas para reiniciar su traducción o proceder a su degradación (Anderson and Kedersha 2008).

Cabe destacar que, a pesar de su diversidad, todos los gránulos de mRNA tienen ciertas características comunes: a) todos ellos contienen mRNAs capaces de re-activar su traducción en respuesta a las señales apropiadas (Brenques, Teixeira et al. 2005, Huttelmaier, Zenklusen et al. 2005); b) comparten numerosas proteínas de unión a RNA que en ocasiones se consideran bases de andamiaje para el gránulo, así como mRNA cargos (Buchan and Parker 2009) y c) todos ellos son enormemente dinámicos en cuanto a sus interacciones, hasta el punto de que

pueden re-convertirse de un tipo a otro en respuesta a determinadas señales (Kedersha, Stoecklin et al. 2005, Mollet, Cougot et al. 2008).

2.3 La traducción del mRNA

La traducción de proteínas es el paso final de la expresión genética, en el cual los tripletes de ribonucleótidos del mRNA son decodificados en términos de aminoácidos para dar lugar a las proteínas. Se divide en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. Todas ellas están altamente reguladas por un gran número de factores, lo que permite responder muy rápidamente a cambios en las condiciones fisiológicas.

2.3.1 Iniciación de la traducción

Durante esta etapa, los mRNAs entran en contacto con la maquinaria ribosomal para, inicialmente formar el complejo de iniciación de la traducción, interactuar con la subunidad menor del ribosoma y finalmente ensamblarse con la subunidad mayor para formar el ribosoma completo. Es la etapa más regulada de la traducción y requiere de la participación de una serie de factores proteicos conocidos como factores de iniciación de la traducción eucariota (eIFs). Resulta especialmente importante la participación del factor eIF4F, un heterotrímero formado por eIF4E, eIF4G y eIF4A. Se encarga de reconocer la estructura 5' cap del mRNA y facilitar el posicionamiento de la maquinaria ribosomal sobre el extremo 5' del mRNA a traducir.

eIF4E en la iniciación de la traducción

Como ya se ha mencionado, el factor eIF4E reconoce específicamente el residuo de 7-metil guanosina tri fosfato (m^7GTP) del extremo 5' de los mRNAs celulares y recluta otros factores de transcripción al lugar de iniciación. Estructuralmente, eIF4E tiene un dominio globular en forma de bolsillo aromático que reconoce el m^7GTP a través de dos triptófanos en las posiciones 56 y 102 de su secuencia de aminoácidos (proteína murina) (Marcotrigiano, Gingras et al. 1997). La interacción con otras proteínas, destacando especialmente eIF4G y 4E Binding Protein (4E-BP) tiene lugar a través de otra región específica donde un triptófano en posición 73 juega un papel fundamental.

La actividad, disponibilidad y efectos de eIF4E en la célula están estrechamente regulados, en especial por cascadas de fosforilación y unión a ciertas proteínas reguladoras. Uno de los mecanismos más importantes para modular la iniciación de la traducción vía eIF4E es alterar su capacidad de interaccionar con eIF4G.

eIF4G en la iniciación de la traducción

eIF4G actúa como proteína de ensamblaje que coordina la disposición de los componentes del complejo eIF4F y la cPABP para establecer un puente entre el mRNA y la subunidad ribosómica 40S. Para ello posee dominios bien diferenciados en su secuencia, encargados de unir los distintos componentes de la maquinaria de iniciación de la traducción.

Al igual que eIF4E, la actividad de eIF4G se regula principalmente por fosforilación, estando los aumentos en los niveles de fosforilación directamente relacionados con su activación y formación del complejo eIF4F. En concreto, la asociación de eIF4G con eIF4E se regula por competición del dominio de interacción de eIF4E con eIF4G mediante proteínas represoras denominadas 4E-BPs, que reconocen el mismo dominio. Cuando las 4E-BPs se encuentran defosforiladas, están asociadas a eIF4E, y ante la acción de quinasas, especialmente la quinasa TOR, la eficiencia de dicha asociación disminuye en beneficio de la asociación eIF4E-eIF4G, fomentando la formación del complejo iniciador (Hay and Sonenberg 2004).

eIF4A en la iniciación de la traducción

eIF4A es una helicasa de RNA de cadena sencilla dependiente de ATP. Se encarga de eliminar las estructuras secundarias cercanas al 5' cap, para facilitar la unión y la migración del complejo de pre-iniciación a lo largo del 5' UTR hasta toparse con el codón iniciador de la traducción. eIF4A se engloba dentro de las llamadas *DEAD-box proteins* (Helicasas tipo DDX, en concreto eIF4A corresponde a DDX2), y posee actividad helicasa tanto en estado libre, como asociada a los complejos de iniciación, donde su actividad se ve enormemente reforzada (Myasnikov, Simonetti et al. 2009, Gustafson and Wessel 2010).

2.3.2 Elongación de la traducción

Una vez ensamblado el ribosoma completo por la acción del reclutamiento de los factores de iniciación se produce la elongación de la traducción. Este proceso consiste en la adición secuencial de aminoácidos al extremo carboxilo terminal del péptido naciente, y es dependiente de GTP. Para que el proceso tenga lugar es necesario en primer lugar, que se produzca la unión del aminoacil-tRNA al sitio A (aminoacil) del ribosoma. A continuación se hidroliza el GTP a GDP con la acción del factor eIF1, con lo cual se forma el enlace peptídico y el peptidil-tRNA se transloca al sitio P (peptidil) del ribosoma. Por último el t-RNA vacío se une al sitio E (*exit*, salida) del ribosoma antes de ser expulsado.

2.3.3 Terminación de la traducción

Cuando un codón de terminación llega al sitio A del ribosoma, no hay ningún complejo aminoacil-tRNA que lo pueda reconocer. De este modo queda expuesto a los llamados factores de liberación eucariotas (eRFs), que promueven la hidrólisis del enlace éster del peptidil-tRNA de forma dependiente de GTP, liberando así el polipéptido recién sintetizado (Inge-Vechtomov, Zhouravleva et al. 2003).

3. Traducción localizada

La traducción local de mRNAs es un importante mecanismo de regulación de la expresión de proteínas. Mediante estos

procesos, mRNAs específicos se transportan a ciertas regiones de la célula en un estado traduccionalmente reprimido. Una vez allí, en respuesta a determinadas señales fisiológicas, la traducción se reactiva y se sintetizan las proteínas requeridas.

La distribución subcelular de mRNAs tiene una elevada prevalencia en organismos eucariotas, desde las levaduras (Gonsalvez, Urbinati et al. 2005) hasta las neuronas (Sutton and Schuman 2006, Bramham and Wells 2007, Jung, Yoon et al. 2012), e incluso ha sido identificada en bacterias (Keiler 2011). La traducción local confiere a las proteínas nuevas herramientas de señalización, y ayuda a mantener la homeostasis del proteoma celular. Al igual que ocurre con otros pasos post-transcripcionales para la regulación de la expresión genética, la localización del mRNA en la célula está coordinada por elementos en *cis* propios de la molécula de mRNA y elementos en *trans*, que suelen ser proteínas de unión a mRNA que reconocen específicamente estos motivos, y dan lugar a mRNPs especializadas en distintos procesos metabólicos.

3.1 Mecanismos de regulación para la traducción localizada

3.2.1 Motivos reguladores en *cis*

Los motivos reguladores en *cis* o CRMs son secuencias específicamente reconocidas por ciertas proteínas de unión a mRNA, que se localizan principalmente en la

zona 3'UTR del mRNA (Andreassi and Riccio 2009), aunque a veces se han detectado también en la zona 5' UTR (Tsai, Bi et al. 2007) o en regiones codificantes (Buckley, Lee et al. 2011). Los CRMs pueden estar definidos por su secuencia (Aschrafi, Natera-Naranjo et al. 2010), estructuras secundarias y/o terciarias (Macdonald and Struhl 1988), o una combinación de ambas. En función del tipo de proteínas que recluten, inducen procesos de distinta naturaleza tales como eventos de transporte, anclaje a membrana, represión de la traducción, determinadas formas de *splicing* alternativo o fenómenos de poliadenilación citoplasmática. Las conformaciones de los CRMs pueden estar reguladas por determinadas condiciones intracelulares o extracelulares, ofreciendo opciones extra de regulación. Además, muchos mRNAs poseen múltiples elementos CRM, que muestran redundancia y diversidad, de modo que a cada mRNA se pueden unir distintas proteínas de unión a RNA (RBPs) conformando una especie de código que determina el destino que ese mRNA debe tener en la célula.

3.2.2 Mecanismos reguladores en *trans*

En los mecanismos de regulación en *trans* se incluyen gran número de proteínas de unión a RNA. Estas proteínas han sido clasificadas en función de sus dominios de interacción con el RNA, que son los que definen su especificidad. Mediante su interacción específica con los CRMs, las proteínas de unión a mRNA son capaces de

reclutar y transportar mensajeros concretos controlando su traducibilidad por distintos mecanismos hasta llegar al compartimento celular diana. Una vez allí, en respuesta a determinadas señales, las mRNPs desenmascaran a su mRNA cargo, su traducción es reactivada y se sintetizan las proteínas requeridas en el momento y lugar adecuados. Generalmente determinadas mRNPs se asocian formando gránulos de transporte de mRNA o mRNPs especializados en distintos procesos y funciones. Cabe destacar que, dentro de un mismo gránulo también podemos encontrar distintos tipos de mRNPs reprimiendo a los mRNAs cargo de formas diferentes.

Ensayos *in vitro* en los últimos años han mostrado que muchas de las proteínas que forman parte de estos gránulos poseen en su secuencia dominios de baja complejidad del tipo de hélice super-enrollada o *coiled-coil*, los cuales las dotan de la capacidad de auto-ensamblarse y desensamblarse rápidamente en complejos de alto peso molecular en respuesta a cambios intracelulares, como alteraciones de temperatura (Kato, Han et al. 2012) y fosforilación (Han, Kato et al. 2012). Éste podría ser el motivo por el que los mRNAs que viajan en este tipo de gránulos se encuentran tan fuertemente reprimidos y son capaces de reactivarse de un modo tan rápido en determinadas condiciones fisiológicas.

De acuerdo con las funciones en las que actúan los gránulos de mRNPs podemos agruparlos en:

Gránulos de mRNPs implicados en control traduccional

Existen un gran número de mecanismos capaces de bloquear la traducción de los mRNAs en procesos de traducción localizada. Como se ha explicado anteriormente dependen de la interacción y el reclutamiento de factores proteicos concretos por acción de elementos en *cis*. Estos gránulos pueden actuar a distintos niveles:

a) Sobre el Complejo de Iniciación: en ocasiones las RNPs constituyentes del gránulo interrumpen la estructuración de complejos de iniciación productivos, bloqueando la formación del complejo eIF4E-eIF4G-cap (Sonenberg and Hinnebusch 2009).

b) Sobre la longitud del PoliA: alterando la longitud de la cola PoliA del extremo 3' del mRNA. Los mRNAs que contienen una cola PoliA corta se ven traduccionalmente reprimidos. En el citoplasma, la proteína CPEB (Proteína Citoplasmática de Unión al Elemento de Poliadenilación) reconoce elementos de poliadenilación citoplasmática ubicados en el extremo 3'UTR del mRNA. Por efecto de esta unión se recluta la proteína Maskin, que une y secuestra eIF4E. CPEB también recluta enzimas deadenilasas que mantienen corta la cola PoliA (Richter 2007). Cuando el mRNA es requerido se produce

una nueva poliadenilación en el citoplasma que recupera a dicho mRNA para su traducción.

c) Sobre la formación del complejo de silenciamiento RISC: los micro-RNAs (miRNAs) se asocian con las proteínas Argonautas (Ago) para formar estructuras determinadas con el mRNA diana, reclutando factores adicionales para conformar el complejo RISC. Éste puede inducir inhibición de la iniciación de la traducción y de la elongación, promover la eliminación de la cola PoliA y desencadenar la degradación del mRNA (Wilson and Doudna 2013).

Gránulos de mRNPs implicados en localización de mRNAs

El mecanismo de transporte de gránulos de mRNAs predominante y más estudiado hasta la fecha tiene lugar a través del citoesqueleto celular. Para ello, a los gránulos de mRNPs se reclutan proteínas adaptadoras específicas que permiten la interacción con motores moleculares concretos como las kinesinas, dineínas o actinomiosinas (Gagnon and Mowry 2011). Se considera que los microfilamentos son la vía empleada para el transporte a pequeñas distancias, mientras que los microtúbulos y sus motores moleculares se emplean para viajes de largo recorrido. En muchos casos las proteínas clave de estos procesos ya son reclutadas por elementos en *cis* del mRNA en el núcleo, en los lugares de transcripción, y acompañan al transcrito a lo largo del

recorrido hasta el lugar de traducción (Oleynikov and Singer 2003).

También se han observado fenómenos de localización de gránulos de mRNPs a ciertos compartimentos mediante procesos de difusión acoplada a reclutamiento local. Al salir del núcleo, las mRNPs difunden a compartimentos concretos de las inmediaciones nucleares y son inmovilizadas por interacción de parte de los componentes del gránulo con ciertas proteínas de andamiaje de dichos compartimentos. Normalmente estos procesos ocurren en fenómenos de localización en zonas asociadas a algún tipo de membrana (Vaccaro, Gigliotti et al. 2010).

Gránulos de mRNPs implicados en estabilidad del mRNA

Muchos gránulos de mRNA contienen proteínas involucradas en la estabilidad de los mRNAs, como HuR o Pab1. En ocasiones los mRNAs se localizan en *P-bodies* durante un corto espacio de tiempo y luego regresan al ciclo de traducción en respuesta a señales asociadas a la finalización del periodo de estrés. Esto sugiere que los gránulos permiten una función de almacenado y represión transitoria de ciertos mRNAs. Otras veces los mRNAs son transportados de un tipo de gránulo a otro, en lugar de regresar al ciclo de traducción, lo que sugiere que estos procesos de almacenamiento y estabilización de mRNAs que tienen lugar en los gránulos

actúan también como un sistema de selección y redistribución de ciertos mRNAs para potenciar respuestas concretas.

3.3 Traducción localizada en neuronas

La traducción localizada cobra especial importancia en células polarizadas con un alto grado de especialización en determinados compartimentos, que necesitan transportar información a través de largas distancias (Jung, Gkogkas et al. 2014). El mejor ejemplo de este tipo de células son las neuronas. Las proyecciones de una neurona pueden expandirse a distancias decenas de veces superiores al tamaño del cuerpo celular, de modo que el transporte continuado de proteínas desde el soma hasta los extremos más distales requeriría días y enormes cantidades de energía. Por este motivo los procesos de traducción localizada juegan un papel esencial en el mantenimiento de la funcionalidad neuronal y su mal funcionamiento está ligado a un gran número de patologías.

Normalmente las neuronas poseen varias dendritas muy ramificadas por donde reciben y computan la información recibida del entorno extracelular y un axón por donde transmiten dicha información al siguiente nivel. En las zonas de comunicación entre las dendritas y los axones, existen compartimentos especializados con una composición única de proteínas, denominados sinapsis.

Siguiendo el flujo de información neurona-neurona, la sinapsis está formada por estructuras derivadas del ensanchamiento de los axones de la neurona presináptica, denominado botón del axón o botón presináptico y unas estructuras derivadas de cambios estructurales en la dendrita de la neurona postsináptica, denominadas espinas dendríticas. Entre la espina dendrítica y el botón axonal se encuentra un pequeño espacio intermembrana denominado hendidura sináptica. La hendidura sináptica tiene una composición molecular única debida a la concentración de distintos iones y metabolitos requeridos para la comunicación neurona-neurona. La fracción de membrana de la espina dendrítica adyacente a esta hendidura sináptica se denomina Densidad Post-Sináptica (PSD), nombre que recibe debido a la alta densidad de proteínas que se concentran en dicha zona. En la PSD resultan especialmente importantes proteínas de membrana como cadherinas e integrinas,

canales e intercambiadores iónicos y gran número de proteínas de andamiaje.

3.3.1 Importancia de la traducción localizada para las neuronas

Las sinapsis están especializadas en adaptarse estructuralmente para fortalecer o debilitar ciertas conexiones neurona-neurona a fin de definir los circuitos neuronales encargados de procesos como el aprendizaje y el establecimiento de memoria a largo plazo. Estas adaptaciones estructurales dependen mayoritariamente de mecanismos de traducción localizada para ser capaces de responder a las señales que reciben del exterior, que normalmente están desencadenadas por alteraciones transitorias del potencial de membrana a las que tan solo cambios rápidos y localizados pueden responder de forma efectiva (Bramham and Wells 2007, Costa-Mattioli, Sossin et al. 2009, Gkogkas, Sonenberg et al. 2010).

La traducción localizada también resulta importante durante el desarrollo

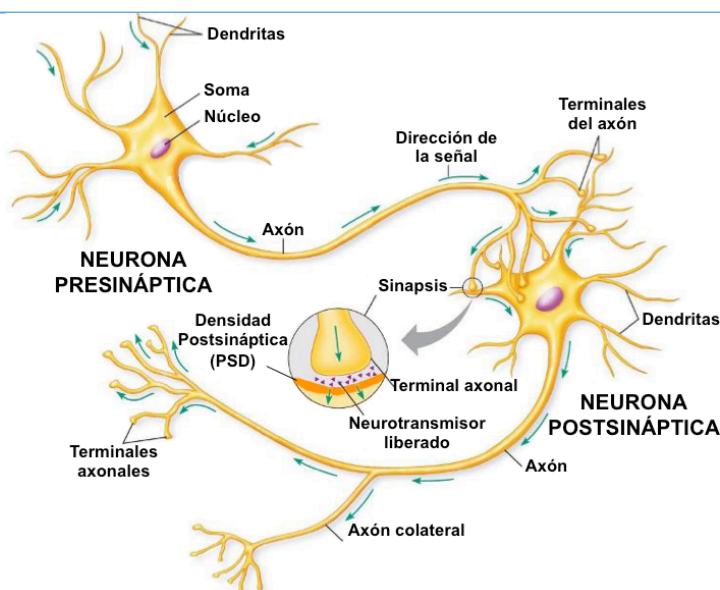


Figura 1: Modelo de sinapsis neuronal

Modelo mostrando la estructura y flujo de información que se da en las conexiones sinápticas neuronales. La dirección de la señal fluye desde la neurona presináptica hasta la neurona postsináptica. En las zonas donde el axón presináptico interacciona con la neurona postsináptica, ya sea en las dendritas o el soma, se produce una especialización de la composición molecular de ambos compartimentos formando lo que se conoce como sinapsis (adaptado de www.easynotecards.com).

neuronal. Las neuronas de ciertas zonas del cerebro deben desarrollar proyecciones citoplasmáticas especiales, denominadas neuritas, para conectarse a compartimentos específicos diana de regiones distales, a fin de desarrollar circuitos neuronales funcionales. Para este fin se produce una compleja regulación espacial y temporal mediante la cual dichas proyecciones son guiadas a su diana por complejas señales químicas de atracción y repulsión. Los cambios estructurales que permiten esta migración también están regulados en gran medida por mecanismos de traducción localizada de proteínas que responden a estas señales guía, lo cual le permite a la neurona en desarrollo integrar la información del entorno con la respuesta estructural (Campbell and Holt 2001).

3.4 Traducción localizada en procesos patológicos

Los gránulos de transporte de mRNAs para la traducción localizada ejercen un gran número de efectos en la función del mRNA, la señalización celular y el mantenimiento de la homeostasis. No es de extrañar, por tanto, que estén vinculados a procesos patológicos de distinta índole.

En neuronas, la desregulación de los niveles de ciertas proteínas implicadas en traducción localizada está vinculada a defectos en el desarrollo neuronal, espinopatías y fallos en plasticidad sináptica, y en los últimos años, se han visto cada vez

más vinculados a enfermedades neurodegenerativas (Wolozin 2012, Buffington, Huang et al. 2014, Walsh, Cooper-Knock et al. 2015). En células germinales, la disrupción de los procesos de traducción local producen efectos muy negativos en el desarrollo embrionario, dando lugar a graves defectos estructurales. En procesos tumorales el aumento en la cantidad de cierto tipo de gránulos, está asociada a una mayor tasa de supervivencia de las células cancerosas (Thedieck, Holzwarth et al. 2013). Por último, en el contexto de la infección viral, los gránulos de estrés y *P-bodies* son secuestrados durante ciertos procesos de infección y replicación, a fin de desvincular la respuesta a estrés desencadenada por la infección de la activación del sistema inmune (Tsai and Lloyd 2014).

Dadas las importantes implicaciones que los mecanismos de traducción local tienen para el mantenimiento de la normal fisiología celular, la mejor caracterización de los gránulos de transporte y sus funciones particulares ha adquirido un enorme interés en los últimos años.

4. Función de hCLE en la célula

4.1 Generalidades

La proteína hCLE, también conocida como CGI-99 y C14orf166, es una proteína de 244 aminoácidos (27 kDa), altamente conservada en distintas especies animales. Se trata de una proteína ubicua, presente tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula, y que se expresa en todos los tejidos analizados hasta el momento en mayor o menor medida (Howng, Hsu et al. 2004).

4.2 Dominios predichos

En nuestro laboratorio ha habido numerosos intentos de obtener la estructura cristalina de esta proteína, sin resultados positivos. Además, la secuencia de aminoácidos que posee hCLE no tiene homología directa con ninguna otra proteína conocida, por lo que en este aspecto se dispone de muy poca información estructural. No obstante, a finales de 2013, un análisis bioinformático de comparación de perfil de proteína y predicción de estructura ubicó a hCLE entre un grupo de proteínas que posee un dominio amino-terminal similar a los llamados dominios homólogos a Calponina (NN-CH). Este dominio lleva adjunta una serie de repeticiones heptaméricas en la zona carboxi-terminal que se predice que forman una estructura de hélice superenrollada o *coiled-coil* (CC) (Schou, Andersen et al. 2014). A este dominio

se le ha denominado “Dominio divergente homólogo a Calponina”.

Los dominios homólogos a Calponina (CH) suelen encontrarse en proteínas asociadas al citoesqueleto y en proteínas de transducción de señales. Normalmente, dos dominios CH en tándem constituyen las zonas de unión a actina de numerosas familias de proteínas que entrecruzan filamentos de actina formando haces o redes (Banuelos, Saraste et al. 1998).

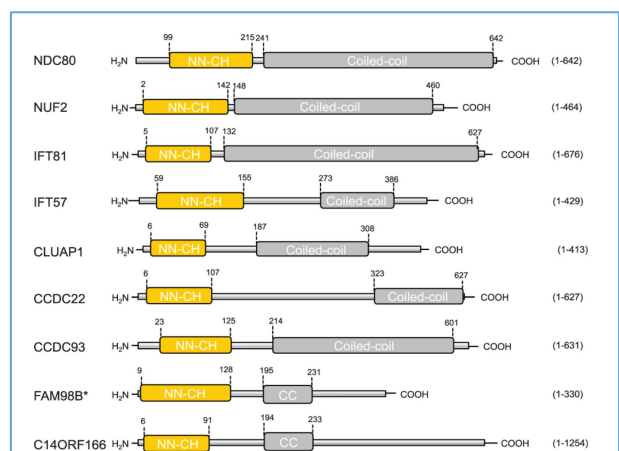


Figura 2: Organización esquemática del dominio NN-CH en el cual se ha identificado hCLE junto a otras proteínas. Se indican los identificadores de la base de datos de UniProt. CC; indica una región de hélice superenrollada o *coiled-coil*. FAM98B* designa a las tres isoformas de FAM98 presentes en humanos (A, B, C). Cabe indicar que la proteína hCLE expresada en humanos tan solo posee 244 aminoácidos, pero en este esquema, adaptado de PMID:24257188, ha considerado un codón stop alternativo.

Por otro lado, las hélices superenrolladas (CC) son zonas asociadas a fuertes interacciones proteína-proteína, tanto para la formación de heterómeros como de homómeros. Esta característica es coherente con publicaciones que muestran que hCLE es capaz de interactuar consigo misma (Howng, Hsu et al. 2004), y con otras publicaciones donde se presenta asociada a

complejos de proteínas con distintas funciones, todas ellas implicadas con el metabolismo del RNA (Drewett, Molina et al. 2001, Rappsilber, Ryder et al. 2002, Kanai, Dohmae et al. 2004, Jeronimo, Forget et al. 2007, Miller, Blandford et al. 2009).

4.3 hCLE y virus

Como se ha explicado al comienzo de esta introducción, hCLE ha sido extensivamente estudiada en nuestro laboratorio en el contexto de la infección por el virus de la gripe, donde se ha mostrado de gran relevancia para la correcta progresión de la infección viral, sobreexpresándose durante la infección y afectando a replicación, transcripción y multiplicidad de la viral. También se ha visto que interacciona directamente con la polimerasa viral y se incorpora en viriones (Huarte, Sanz-Ezquerro et al. 2001, Perez-Gonzalez, Rodriguez et al. 2006, Rodriguez, Perez-Gonzalez et al. 2011, Rodriguez-Frandsen, de Lucas et al. 2016). Cabe destacar que hCLE también se ha descrito interaccionando con proteínas estructurales de otros virus de RNA, como Hepatitis C (HCV) (Lee, Liao et al. 2011), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Kula, Guerra et al. 2011) o el virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV) (Emmott, Munday et al. 2013).

En el contexto de HCV, se ha identificado a hCLE como una proteína que interacciona con la proteína del core del virus. La proteína del core forma la

nucleocápside viral y está implicada en persistencia del virus y patogenicidad viral. Las interacciones con los factores del huésped modulan la replicación del HCV y su acoplamiento con las funciones celulares (Lee, Liao et al. 2011).

En el contexto de HIV, hCLE está presente en el proteoma asociado a la secuencia RRE (Elemento de Respuesta Rev) presente en el genoma viral. RRE es una secuencia contenida en el segmento que codifica la envuelta del virus que actúa como activador post-transcripcional en coordinación con la proteína viral Rev, y que resulta esencial para el transporte núcleo-citoplasmático de los RNAs virales (Kula, Guerra et al. 2011).

Por último en el caso de infección por IBV, un tipo de coronavirus implicado en episodios de bronquitis en pollo, hCLE también se ha identificado como parte del interactoma de la proteína N de la nucleocápside viral. Esta proteína juega importantes papeles a lo largo de todo el ciclo de vida del virus, desde la regulación de la replicación y la transcripción del genoma viral, hasta su empaquetamiento y la modulación de los procesos celulares del huésped (Emmott, Munday et al. 2013).

La presencia de hCLE en interactomas de virus de RNA parece estar bastante extendida y apoya la idea de que su papel en el contexto celular puede resultar de gran interés en procesos básicos del ciclo celular,

que son los que normalmente los virus se ven obligados a emplear para completar su ciclo vital.

4.4 hCLE y la célula

4.4.1 Relación de hCLE con el ciclo celular

Existe poca bibliografía acerca de la función de hCLE. La mayor parte de las publicaciones presentan a hCLE como una proteína vinculada a gran número de procesos tumorales en distintos tejidos tales como: cerebro (Howng, Hsu et al. 2004) , útero y nódulos linfáticos (Zhang, Ou et al. 2015), pecho (Cheang, Zhou et al. 2016), vejiga (Chen, Ye et al. 2016), páncreas (Cui, Wu et al. 2009) y nasofaringe (Yang, Li et al. 2015). Estos estudios han propuesto hCLE como un buen candidato a marcador tumoral e incluso de pronóstico de la enfermedad. Se cree que esta implicación de hCLE en procesos tumorales está asociada a un posible papel regulador en la arquitectura del centrosoma, relacionada con un efecto sobre el ciclo celular (Howng, Hsu et al. 2004). Los centrosomas son grandes orgánulos multiproteicos que organizan los microtúbulos del huso mitótico, ayudando a posicionar el huso en el interior de la célula, además de regular la polaridad y la movilidad celular (Morgan 2007). En este tipo de estructuras, la proteína hNineína se encuentra jugando un importante papel en el anclaje de los extremos negativos de los microtúbulos. Se ha visto que hCLE es capaz de interactuar con hNineína bloqueando su

fosforilación, proceso requerido para que ésta efectúe sus funciones de estabilización y posicionamiento de los microtúbulos (Howng, Hsu et al. 2004). En este trabajo se propuso que hCLE podría afectar al ciclo celular mediante un cierto grado de control en la fase de la mitosis.

4.4.2 Relación de hCLE con la transcripción de los mRNAs

Datos previos de nuestro grupo acerca de la función de hCLE en la célula, mostraron que hCLE es un modulador positivo de la transcripción general de mRNAs, mediante la interacción directa con la RNAPII celular (Perez-Gonzalez, Rodriguez et al. 2006).

El estado de fosforilación del dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor (RPB1) de la RNAPII varía en función de la etapa del ciclo de transcripción en la que se encuentre. hCLE interacciona con RPB1, tanto con su forma inactiva, como con las formas activas asociadas a la iniciación de la transcripción y a la elongación del mRNA. Además hCLE se encuentra en lugares del núcleo asociados a transcripción activa de mRNAs y cuando se encuentra silenciada, se obtiene una inhibición del 50% de la síntesis total de mRNAs, de modo inespecífico.

4.4.3 Relación de hCLE con el procesamiento de los mRNAs

hCLE también ha visto asociada a mecanismos de maduración y procesamiento del mRNA, que probablemente vengan

mediados por su ya mencionada interacción con RPB1. RPB1, y en particular su CTD, interacciona con una gran cantidad de complejos proteicos con funciones muy importantes en el metabolismo del mRNA, tales como factores de elongación de la transcripción, complejos remodeladores de cromatina y enzimas de maduración del pre-mRNA entre otros. No es de extrañar, por tanto, que hCLE se haya identificado como miembro del interactoma de distintos complejos proteicos de distinta naturaleza, tales como el complejo del enzima de *capping* del snRNA 7SK (Jeronimo, Forget et al. 2007), el complejo de *splicing* de la tRNA ligasa (Rappsilber, Ryder et al. 2002), y complejos proteicos vinculados a la regulación transcripcional vía unión al ADN celular (Drewett, Molina et al. 2001).

4.4.4 Presencia de hCLE en gránulos de transporte de RNA en neuronas

hCLE se ha identificado en estudios proteómicos sobre la composición de distintos gránulos neuronales de transporte de RNAs. Como ya se ha mencionado, estos gránulos de transporte están compuestos por una gran variedad de proteínas y sujetos a complejos mecanismos de regulación. Se ha visto que hCLE está presente en gránulos de transporte destinados a la traducción localizada de mRNAs de gran importancia para la correcta respuesta y adaptación sináptica de las dendritas. Se puede observar que, aunque hCLE es identificado en distintos gránulos, la naturaleza de las proteínas

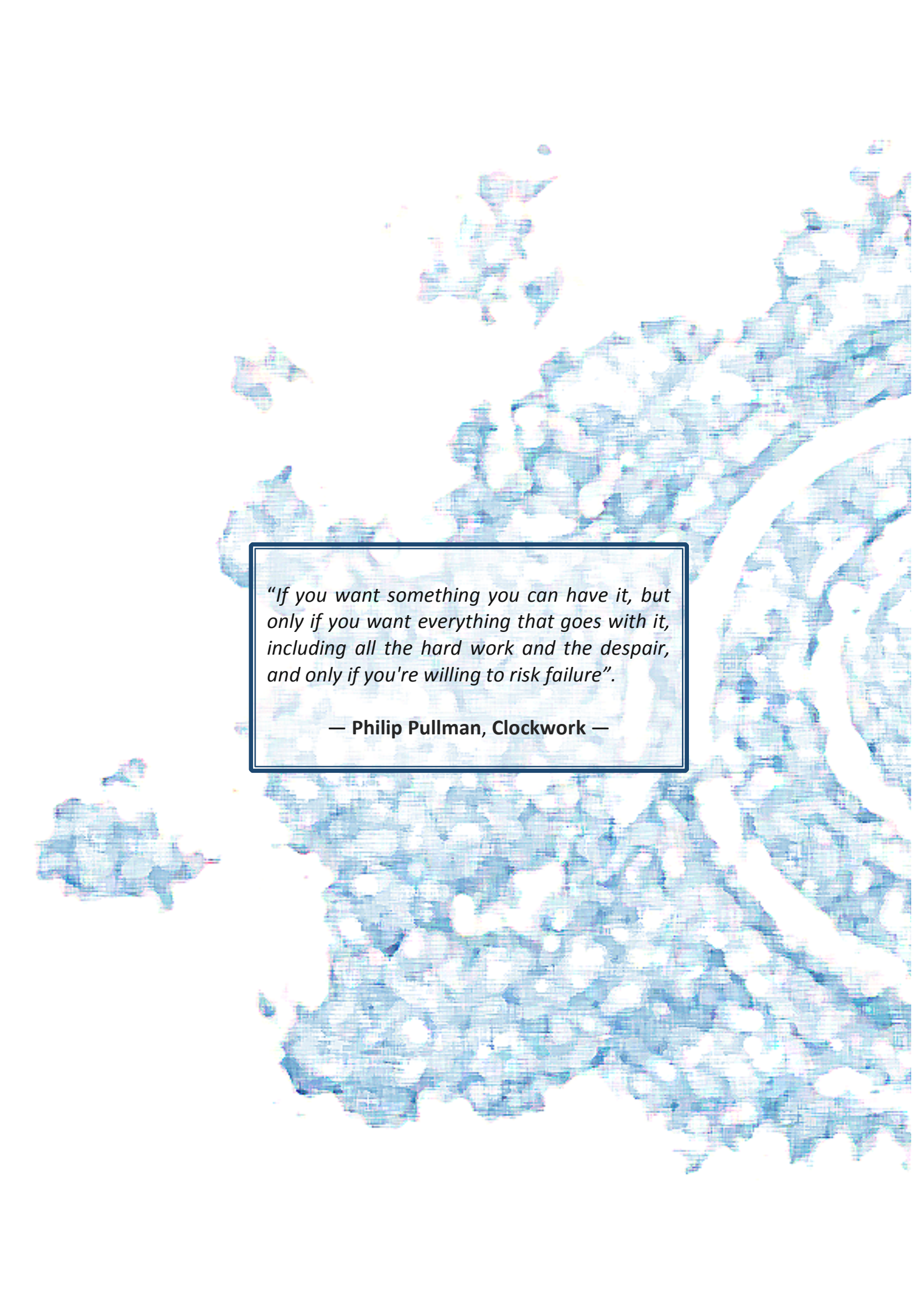
acompañantes dentro del gránulo sufre variaciones. En un trabajo publicado por el grupo de Hirokawa (Kanai, Dohmae et al. 2004) los gránulos de RNA donde se identificó hCLE, obtenidos de cerebro de ratón adulto, contenían mRNAs como Arc y CamK II alfa, importantes en procesos de plasticidad sináptica y consolidación de la memoria (Korb and Finkbeiner 2011, Lucchesi, Mizuno et al. 2011, Buxbaum, Wu et al. 2014) e incluían proteínas como NonO, Staufen o ALY, implicadas en procesamiento de mRNAs, procesos de ensamblaje y exporte al citoplasma además de algunas proteínas ribosomales. Estos gránulos se acoplan a kinesina convencional (KIF5) y se mueven bidireccionalmente a lo largo de la dendrita, en coordinación con motores opuestos como dineína (Kanai, Dohmae et al. 2004, Elvira, Wasiak et al. 2006, Miller, Blandford et al. 2009). El grupo de Sossin (Elvira, Wasiak et al. 2006) , a partir de muestras de embrión de rata a día 18, identificó un tipo de gránulos que contenían hCLE en los cuales se identificaron distintas RNPs, ribosomas y el mRNA de beta-actina. Los componentes de estos gránulos embrionarios difieren en parte con los identificados en los gránulos de cerebro adulto, por ejemplo en el contenido de la proteína Staufen. Otra diferencia es que estos gránulos embrionarios parecían acoplarse a dineína como motor molecular en lugar de a kinesina. Atendiendo a sus componentes se ha propuesto que podrían estar jugando un papel importante en el desarrollo neuronal y en concreto en el

crecimiento de las neuritas, donde la beta-actina es indispensable para dirigir los conos de crecimiento axonales.

A pesar de estas diferencias entre gránulos de cerebro adulto y gránulos de cerebro embrionario, resulta destacable el hecho de que existían proteínas comunes entre ambos tipos de gránulos, como hCLE y DDX1 y un gran número de snRNPs. Se desconoce si la diferencia entre los gránulos obtenidos de tejido adulto y embrionario es debida a diferencias en el estado de desarrollo o a que se trata de gránulos de distinta naturaleza. Distintos grupos proponen que las proteínas comunes en ambos gránulos, como por ejemplo hCLE, podrían estar actuando como proteínas adaptadoras críticas para la formación de estructuras de transporte de RNA en distintos tipos de gránulos (Sossin and DesGroseillers 2006) .

4.5 Importancia del estudio de hCLE en la célula

Como se ha visto a lo largo de este apartado, existe mucha información que sugiere un papel importante de hCLE en el metabolismo del mRNA y más en concreto, en procesos de transporte y traducción localizada, que podrían jugar un papel en la regulación del ciclo celular. Sin embargo su función específica no ha sido descrita todavía. Una caracterización en detalle de los procesos en los que hCLE está presente en el contexto celular, centrado en posibles efectos en transporte y regulación de la traducción de mRNAs, podría favorecer la identificación de nuevos mecanismos moleculares de regulación de la traducción, potencialmente extrapolables a procesos de función neuronal como son los mecanismos de plasticidad sináptica y conectividad neuronal.



"If you want something you can have it, but only if you want everything that goes with it, including all the hard work and the despair, and only if you're willing to risk failure".

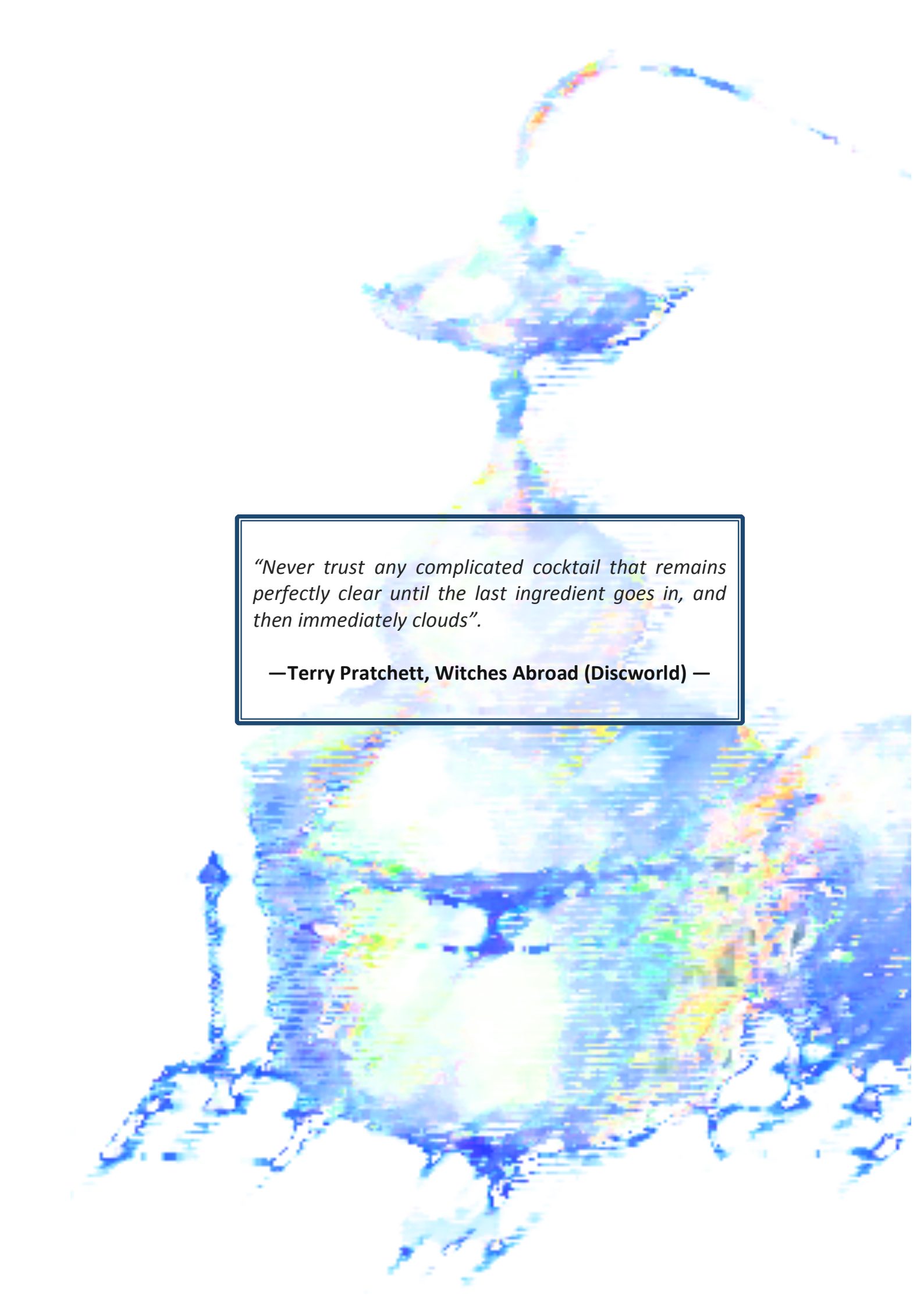
— Philip Pullman, Clockwork —



OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1.** Caracterización de las proteínas que se asocian a hCLE e identificación de aquellas que componen el complejo más estable y su relación funcional con hCLE.
- 2.** Identificación de los RNAs que se asocian al complejo de hCLE.
- 3.** Caracterización funcional del complejo de hCLE en el transporte y traducción de los mRNAs.
- 4.** Análisis funcional de hCLE en el contexto neuronal.



“Never trust any complicated cocktail that remains perfectly clear until the last ingredient goes in, and then immediately clouds”.

—Terry Pratchett, Witches Abroad (Discworld) —



MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Materiales Biológicos

1.1 Cultivos Primarios:

1.1.1 Células hipocampales de rata

Cultivos preparados de hipocampo de ratas Wistar de 0 o 1 días de edad que se utilizaron para las inmunofluorescencias de células neuronales, a distintos tiempos después de la siembra.

1.1.2 Células corticales de rata

Cultivos preparados de corteza de embriones de ratas Wistar de 19 días, se utilizaron a día 16 tras ser plaqueadas para los experimentos de unión a resinas de análogo de 5' cap.

1.2 Líneas Celulares:

1.2.1 Células HEK 293T:

Human Embryonic Kidney cells; células embrionarias humanas de riñón, cedidas por J.C. de la Torre. Herramienta principal del laboratorio empleada por su facilidad para la transfección y el silenciamiento por vectores lentivirales.

1.3. Estirpes bacterianas:

1.3.1 DH5alfa:

Cepa bacteriana utilizada para la amplificación de todos los plásmidos.

1.4 Virus:

1.4.1 Vaccinia T7:

Virus vaccinia recombinante vTF7-3, que expresa la RNA polimerasa del bacteriófago T7. Empleada para la sobreexpresión a gran escala de proteínas susceptibles de purificación en células eucariotas. El virus fue cedido por B. Moss (Fuerst, Earl et al. 1987)

1.4.2 Vectores Lentivirales:

Virus recombinantes derivados de retrovirus que sirven para integrar distintos tipos de RNAs en el núcleo de las células infectadas (Amado and Chen 1999). Se emplearon lentivirus reconstituídos con la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV).

2. Otros materiales biológicos

2.1 Plásmidos:

2.1.1 Plásmidos para la sobreexpresión de hCLE:

El plásmido pRSET-hCLE que expresa la proteína hCLE con la etiqueta de poli-Histidinas en el amino terminal , junto con los que expresan las regiones amino y carboxi terminal, también con la etiqueta de poli-Histidinas fueron contruidos y cedidos por M. Huarte.

El plásmido pC -TAP que expresa hCLE con una etiqueta para purificación en Tándem (TAP) en el extremo carboxilo

terminal y los plásmidos pCDNA3.1_hCLE y pCDNA3.1_hCLE-no_silenciable, que sirven para expresar el hCLE endógeno o hCLE con una mutación puntual para hacer la proteína no silenciada por shRNAs, fueron generados y cedidos por A. Pérez.

El plásmido pC1-PAGFP que sirvió como control negativo en los ensayos de fotoactivación de hCLE, y en el que se clonó hCLE para generar un pC1-PAGFP-hCLE fue cedido por J. Lippincott-Schwartz, y el pC1-PAGFP-hCLE fue generado y cedido por A. Pérez.

2.1.2 Plásmidos para la generación de vectores lentivirales:

Para la producción de vectores lentivirales de silenciamiento se empleó el plásmido de envuelta pMD2.G (Addgene #12259) y el plásmido de empaquetamiento

psPAX2 (Addgene #12260). Como portadores de los insertos de shRNA se emplearon dos plásmidos diferentes, el pLKO.1puro (Addgene #8453) y el pLL3.7 (Addgene #11795). En el caso del pLKO.1puro el mecanismo de selección de las células silenciadas es puromicina. Como control del pLKO.1 puro se empleó un shRNA dirigido contra *Thermotoga marítima* (pLKO_TM) sin efecto en células eucariotas, y para el silenciamiento de hCLE se empleó un shRNA diseñado y analizado por A. Rodríguez-Frandsen (pLKO_CLE).

2.2 Anticuerpos:

2.2.1 Anticuerpos primarios:

Los anticuerpos primarios empleados se especifican en la tabla 1.

TABLA1: Anticuerpos Primarios							
Nombre	Tipo	Especie	Origen	WB	IPP	IF	Referencia
DDX1	Policlonal	Cabra	Santa Cruz	1:1000	-	1:50	sc-49817
DDX1	Monoclonal	Ratón	Abcam	1:2000	1:20	1:300	ab77213
eIF4E	Monoclonal	Ratón	Transduction Labs	1:1000	-	-	610269
Fam98B	Monoclonal	Conejo	Abcam	1:10000	1:20	-	ab179833
Fam98B	Policlonal	Conejo	Sigma	1:3000	-	-	HPA008320
hCLE	Policlonal	Conejo	M. Huarte	-	1:20	1:250	*389
hCLE	Policlonal	Conejo	Abcam	1:1000	-	-	ab49342
Homer1	Monoclonal	Ratón	Synaptic Systems	-	-	1:500	160011
HSPC117	Policlonal	Cabra	LifeSpan	1:3000	1:20	1:500	LS-C139785
MAP2K	Monoclonal	Ratón	Abcam	1:500	-	-	ab11267
PSD-95	Monoclonal	Ratón	Millipore	1:500	-	1:100	MAB1596
RNAP II 8WG16	Monoclonal	Ratón	Covance	1:1000	-	-	MMS-128P
S6	Monoclonal	Ratón	Cell Signalling	1:1000	-	-	54D2
Sinaptofisina	Monoclonal	Ratón	Sigma	1:1000	-	-	s5768
Tubulina β	Monoclonal	Ratón	Abcam	1:5000	-	-	ab11568
V-Glut1	Policlonal	Cobaya	Synaptic Systems	-	-	1:1000	135304

2.2.3 Anticuerpos secundarios:

Los anticuerpos secundarios usados para WB se obtuvieron de Sigma y fueron:

- Cabra anti conejo unido a peroxidasa de rábano.
- Cabra anti ratón unido a peroxidasa de rábano.
- Conejo anti cabra unido a peroxidasa de rábano.

Los anticuerpos secundarios usados para inmunofluorescencia son:

- Cabra anti ratón acoplado a fluoróforo.
 - Cabra anti conejo acoplado a fluoróforo.
 - Burro anti cabra acoplado a fluoróforo.
- * Los fluoróforos se eligieron en función de las necesidades de cada experimento, y eran Alexa 488 para luz verde, Alexa 546 para luz roja, Alexa 594 también para luz roja y Alexa 647 para luz azul.

Para marcaje del núcleo en inmunofluorescencia se usó la tinción DAPI.

MÉTODOS

1. Manipulación de ADN y clonajes

1.1 Obtención de plásmidos.

Los plásmidos se generaron mediante la transformación y crecimiento en medio selectivo de bacterias DH5alfa, seguido de la extracción del plásmido utilizando el kit de maxipreparaciones de Qiagen siguiendo las especificaciones del fabricante, con la excepción de que el DNA fue resuspendido en H₂O en lugar de la solución de resuspensión de plásmido (TE) facilitada en el kit.

1.2 Diseño y generación de plásmidos lentivirales de silenciamiento.

Los plásmidos para la generación de lentivirus para el silenciamiento de hCLE se diseñaron empleando como dianas las posiciones 121 a 143 (siCLE.1) y 417 - 435 (siCLE.2) en el cDNA de hCLE. Fueron generados por inserción de los cebadores-adaptadores (5' CCGGTAAGA TTGAAGACAGAGGGAATTTTCAAGAGAAAATT CCCTCTGTCTTCAATCTTTTTTG 3' , 5' AATT CAAAAAAGATTGAAGACAGAGGGAATTTCTCT TGAAAAATTCCCTCTGTCTTCAATCTTA 3') y (5' CCGGTCCTGCTTCAGATTGAGCGTTTCAAG AGAACGCTGAATCTGAAGCAGGTTTTT3' , 5' 'AATTCAAAAACCTGCTTCAGATTGAGCGTTCTC TTGAAACGCTGAATCTGAAGCAGG 3') respectivamente, tras el promotor de U6 en el vector pLKO-puro (Addgene # 8453),

digerido con los enzimas Agel/EcoRI. El plásmido del shRNA control expresa una secuencia procedente de la bacteria *Thermotoga maritima*, y fue generado siguiendo una estrategia similar, mediante la inserción del cebador adaptador (5'CCGGTAATTCTCCGAACGTGTCA CGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCTGGAGAATT TTTTGG 3' and 5' AATTCAAAAAAATTCTCCGAACGT GTCACGTTCTCTTGAACGTGACACGTTCTGGAG AATTA 3'). El pCDNA-hCLE resistente al silenciamiento fue generado por introducción de tres mutaciones silenciosas en las posiciones 126, 135 y 141 en la secuencia diana del cDNA de hCLE utilizando el kit de mutagénesis dirigida *QuickChange Site-Directed mutagenesis kit* de Stratagene.

Las partículas lentivirales fueron producidas en células HEK293T por co-transfección de los plásmidos que codifican los shRNAs, dirigidos contra las ya mencionadas regiones del mensajero de hCLE, junto a los plásmidos necesarios para la expresión de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (pMD2.G, Addgene #12259 and psPAX2, Addgene #12260). Los sobrenadantes celulares se recogieron 40 horas después de la transfección, se filtraron en filtros de 0.45µm, se partieron en alícuotas y se mantuvieron a -80°C hasta que fueron requeridos.

2. Manipulación de cultivos celulares

2.2 Línea Celular HEK293T.

2.2.1 Mantenimiento de las línea:

Las células HEK293T se mantienen en medio de Eagle modificado por Dulbecco, DMEM, con 1% de suero fetal bovino (FBS)

2.2.2 Transfección:

La transfección de células HEK293T se realizó mediante el método del fosfato cálcico. En resumen, se emplean células HEK293T en una confluencia del 60-70%, pasadas del día anterior. El plásmido a transfectar (10µg/5.85x10⁶células = 1 placa de 100mm al 65% de confluencia) se diluye en una solución de Cloruro Cálcico 250mM, en un volumen no superior al 6% del volumen de la placa. A continuación esta solución se diluye 1:1 en HBS (50mM HEPES, 1,5mM de Na₂HPO₄, 140mM NaCl). Se deja reposar la mezcla durante unos 5 minutos y a continuación se añade a las células gota a gota. Se dejan las células expresando el plásmido transfectado durante 12, 24 o 48 horas en función de los requerimientos del experimento y el tipo de plásmido.

2.2.3 Tratamiento con drogas:

Para el tratamiento de las HEK293T con distintos tipos de drogas se prepara medio fresco DMEM con 1% de Suero Fetal Bovino con la concentración final de la droga deseada. Se cambia el medio viejo de las

HEK293T y se añade el medio nuevo debidamente atemperado a 37°C.

2.2.4 Transfección-Infección con Vaccinia T7:

Células HEK293T se infectaron con Vaccinia T7 a una multiplicidad de infección (M.O.I.) de 5 partículas infectivas por célula. Al finalizar la infección las células fueron transfectadas con los plásmidos pRSET_His_CLE, pRSET_CLE_His, pRSET_His_1-120, pRSET_His_120-244 y pRSET_n1His. 48 horas después de la transfección-infección se realizaron extractos totales de proteína celular y las proteínas etiquetadas con Histidinas fueron purificadas por cromatografía de afinidad en resinas de Níquel ProBond (ThermoScientific, referencia R801-01)

2.2.5 Obtención de extractos nucleares y citosólicos:

Para la separación núcleo-citoplasmática, células HEK293T previamente tratadas con las condiciones de interés se lavan con PBS1X. A continuación se centrifugan durante 5 minutos a 1,200 rpm y 4°C. Se retira el sobrenadante y se repite el paso anterior. Tras el segundo lavado el precipitado de células se reuspende en un buffer hipotónico que contiene 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM KCl, 0.1% NP-40, 1 mM EDTA, inhibidores de proteasas y fosfatasas (Complete y PhosSTOP, Roche) en presencia o ausencia de 1mM de DTT en función de los requerimientos del experimento. A continuación se procede a un centrifugado a 3,000 rpm y 4°C. El pellet está constituido por

los núcleos y el sobrenadante los citoplasmas. Se separa el pellet a un nuevo tubo y se trata durante 30 minutos en una solución que contiene 0.5% NP-40, 50 mM Tris pH8, 0.4M NaCl, 0.2 mM de EDTA y 10% de Glicerol, suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. A este buffer puede retirarse el EDTA y el Glicerol según los requisitos del experimento. Tras la incubación se centrifuga durante 5 minutos a 3,000 rpm, y se retira el pellet (restos de membranas). El sobrenadante es el extracto nuclear.

2.3 Células hipocampales de rata

Ratas Wistar de 0 o 1 días de edad fueron procesadas para la disección del hipocampo. La temperatura corporal de las ratas para la analgesia se indujo dejándolas 5 minutos sobre hielo. El cerebro se extrajo en solución de disección compuesta por medio balanceado de Earle, en presencia de HEPES a pH 8. Se extrajeron las meninges cuidadosamente y a continuación se diseccionó el hipocampo. El tejido fue sometido a una digestión en una solución compuesta por medio de disección en presencia de EDTA, DNAsa, CaCl₂ L-Cys, y 20 unidades de papaína/mL. Se incubó en esta solución durante 25 minutos a 37 °C para la disociación del tejido. Tras la digestión se extrae la solución de digestión y se lava el tejido 3 veces con solución de crecimiento compuesta por BME, 10% de suero fetal bovino, piruvato sódico, Glucosa y una mezcla de antibióticos compuesta por Penicilina y Estreptomicina (Pen/Strept)

siguiendo las especificaciones del proveedor. Tras los lavados se homogeniza el tejido pipeteando 4-5 veces. El contenido en células se cuenta en una cámara de Neubauer y se plaqueta una densidad de 14,000 células por cada pocillo de 20 mm de placas multipocillo de 24 tratadas con polilisina y colágeno, y sobre las que se ha crecido previamente una monocapa de astrocitos. Se deja reposar el cultivo durante 2-4 horas. Después de este tiempo, se cambia el medio a medio de diferenciación neuronal compuesto por Neurobasal, Pen/Strept, glucosa, vitamina B27, Glutamax, y solución de extensión de suero MITO (Corning).

A los 3-4 días post-plaqueo se añade AraC en el medio para impedir sobrecrecimiento de las células de la glía, y los cultivos se mantienen refrescando el medio con medio de diferenciación neuronal fresco cada 3 días. Los cultivos se emplean a distintos tiempos tras la siembra en función de los requerimientos del experimento.

2.4 Células corticales de rata

Cultivos preparados de corteza de embriones de ratas Wistar de 19 días y se utilizaron a día 16 tras ser plaqueadas como se explica en (Lopez-Menendez, Gascon et al. 2009). Estos cultivos se emplearon para los ensayos bioquímicos de hCLE (análisis de silenciamiento, capacidad de unión a resinas de análogo de 5' cap y análisis de cambios en los niveles de expresión de la proteína a lo largo del tiempo).

2.5 Preparaciones de sinaptosomas.

Ratas de 3 meses de edad del tipo *Wistar* fueron sacrificadas con CO₂. A continuación se procedió a la decapitación y extracción del cerebro en PBS 1X. Se eliminaron el cerebelo y el mesencéfalo. A continuación el tejido córtico-hipocampal resultante, libre de meninges, se homogeneizó al 10% p/v en HEPES pH7.4 con 0.32M de sacarosa e inhibidores de proteasas y fosfatasas concentrados 2 veces. Se empleó un homogeneizador cristal-cristal y 4 pases con el émbolo suelto y 8 pases con el émbolo ajustado. Los núcleos fueron eliminados por una centrifugación de 1,000g a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante, que contenía los extractos citoplasmáticos y sinaptosomales fue transferido a un nuevo tubo y diluido 1:1 en HEPES pH 7.4 con 1.3M de sacarosa, dejando una concentración final de 0.8M de sacarosa. La solución se centrifugó durante 30 minutos a 4°C y 20,000g. Tras esta centrifugación, el sobrenadante resultante es la fracción no synaptosomal o citoplasmática, y los precipitados son los sinaptosomas. Los sinaptosomas se procesan mediante un lavado inicial con HEPES pH 7.4 seguido de un centrifugado de 10 minutos a 10,000 rpm y 4°C. Tras esta centrifugación se descarta el sobrenadante. El precipitado se trata con solución RIPA modificada para contener 0.02% de SDS, 0,2% de TX-100 e inhibidores de proteasas y fosfatasas. Se realiza una centrifugación de 30 minutos a 20,000 rpm y

4°C para romper los sinaptosomas. El sobrenadante son los extractos de sinaptosomas. El contenido total de proteína se mide con un kit de BCA de Pierce (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las especificaciones del fabricante.

3. Manipulación y análisis de RNA

3.1 Extracción de RNA de células eucariotas

Se emplearon mayoritariamente extractos totales de pellets celulares que contenían 2.5×10^6 células resuspendidas en 1mL de TRIzol (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El RNA fue digerido con DNAsa libre de RNAsa (1U/mg) durante 1 h a 37°C. A continuación se realizó una extracción con fenol-cloroformo y el RNA se precipitó con etanol y se resuspendió en H₂O DEPC.

La obtención directa del RNA de una resina o proteína purificada se realiza por el método del fenol cloroformo. Cuando la resina o proteína purificada están listas para ser procesadas, se tratan con proteinasa K (Sigma) durante 1h a 37°C. A continuación se extraen mediante la adición de 1 volumen de fenol-cloroformo y el RNA se precipita con etanol absoluto, 1 x TNE y Glucógeno. A continuación se deja precipitando toda la noche a -20°C. Tras la precipitación se centrifuga durante 30 minutos a 10,000 rpm, se lava 2 veces con etanol al 70%. Se

resuspende en agua y se trata con DNAsa libre de RNAsa (1U/mg) durante 1 h a 37°C. Se repite la precipitación con fenol-cloroformo como se ha explicado anteriormente y tras la precipitación se deja el RNA resuspendido en el volumen deseado de H₂O DEPC.

3.2 Transcripción *in vitro*

La transcripción *in vitro* dirigida por las polimerasas T7 o T3 (Roche) se realizó siguiendo las recomendaciones del proveedor tanto para transcripción *in vitro* convencional, como para el marcaje de sondas con isótopos radiactivos.

3.3 Marcaje terminal de sondas de hibridación

El marcaje terminal de las sondas de oligo-dT para marcar RNAs poliadenilados se realizó empleando como molde un oligonucleótido de 27 deoxitimidinas que se trató con Polinucleótido Kinasa (PNK, NewEngland Biolabs) en presencia de γ ATP³² siguiendo las especificaciones del fabricante. Tras el marcaje la sonda fue separada del nucleótido libre empleando columnas de Illustra MicroSpin G-25 (GE-Healthcare).

3.3 Cromatografía Oligo-dT

Los RNAs resuspendidos en H₂O DEPC se llevan a un volumen al 1% de Sarcosil y se hierven a 100°C durante 3 minutos. A continuación se añaden a resinas de oligo-dT previamente equilibradas en el buffer A+ que contiene 0.5M ClNa, 0.5% Sarcosil y 10 mM

Tris-HCl pH 7.5. Los RNAs también se dejan en una solución de estas características y se incuban con la resina durante 1 minuto, seguido de una centrifugación de 1 minuto a 1,500 rpm y 4°C. La muestra no retenida es la fracción PoliA-. Se repite la incubación de dicho filtrado en la resina una vez más. La fracción Poli A+ retenida en la resina se lava dos veces con 100µL del buffer A+. Finalmente, la fracción PoliA+ se eluye en dos pasos, en el primero con 1% de Sarcosil, y en el segundo con H₂O DEPC. La elución también se repite una vez más. Los RNAs PoliA+ resultantes se precipitan añadiendo TNE 1X y etanol, y se utilizan a conveniencia del experimento.

3.4 Geles de Agarosa para RNA

Para los geles de agarosa de RNA se disuelve la agarosa en la concentración deseada en solución MOPS y formaldehído hasta un 4% v/v. Las muestras de RNA se diluyen en tampón de formalina 1:1 y se hierven 3 minutos a 100°C, inmediatamente se pasan a hielo y a continuación se le añaden 100µL/mL de Bromuro de Etidio diluido 1/500. El gel se resuelve a 100 voltios durante aproximadamente 1 hora.

3.5 Northern Blot

Los RNAs separados mediante geles de agarosa se transfieren a membranas de Nylon durante toda la noche a temperatura ambiente en una solución de 10x SSC (1.5M NaCl, y 150mM de Na₃C₃H₅O (COO)₃ (citrato trisódico) a pH 7.0). Tras la transferencia, los

RNAs se fijan a la membrana durante 2 horas a 80°C. A continuación se incuban la membrana durante 2 horas a 65°C en el buffer de prehibridación/bloqueo que contiene 6x SSC, 5x agente Denhardt (0.1% Ficoll, 0.1% polivinilpirrolidona, 0.1% seroalbúmina bovina peso/volumen), 0.5% SDS, 100µg/mL RNA de levadura y 50µg/mL ssDNA de espermatozoos de salmón. Tras la preincubación al tampón de hibridación se le añaden 500,000 cpm/mL de la sonda de interés y se incuban con la membrana durante toda la noche a 65°C. Tras la incubación la membrana se lava con 2xSSC y 0.1% SDS precalentado a 65°C. Se seca la membrana y se expone y revela mediante una pantalla de *Phosphorimager*.

3.6 Dot-Blot

Los RNAs se resuspenden en un buffer que contiene 10X SSC y 7.5% de Formaldehído. A continuación se hierven durante 5 minutos a 100°C, se pasan inmediatamente a hielo y se aplican a membranas de nylon anafotérico previamente hidratadas en 10X SSC, mediante la aplicación de vacío. Los RNAs se fijan a la membrana mediante una incubación de 2h a 80°C. Tras la fijación, las membranas fueron tratadas de modo idéntico a las membranas de Northern Blot, incluyendo los pasos de prehibridación, hibridación, lavado y revelado en el *Phosphorimager*.

3.7 Caracterización de RNAs

asociados a hCLE

Células HEK293T fueron transfectadas con el plásmido pC-hCLE-TAP o el plásmido vacío pC-TAP como control. La purificación por TAP se realizó como se describe en el punto 4.2, en condiciones que aseguran la máxima conservación del RNA, llegando hasta el paso de tratamiento con la proteasa TEV (Invitrogen). Tras dicho tratamiento las proteínas eluídas fueron tratadas con proteinasa K (Sigma) y los RNAs extraídos y precipitados mediante el método del fenol-cloroformo seguido de una incubación durante 12 horas con isopropanol a 4°C. Los RNAs precipitados fueron resuspendidos en H₂O DEPC e incubados con DNasa I (Ambion), seguido de una nueva extracción con fenol-cloroformo para eliminar los restos de DNasa I. Para la secuenciación masiva se emplearon cantidades análogas de células en cada una de las condiciones. Para el proceso de lectura se empleó el sistema *TruSeq v3 chemistry* y las lecturas de 50pb se tomaron a partir de una máquina *illumina HiSeq 2000*.

3.7 Análisis de datos de secuenciación masiva.

Se analizó la calidad de las lecturas en formato FASTQ crudas en la aplicación online FASTQ (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Para cada muestra, las lecturas individuales fueron

alineadas contra el genoma humano, mediante un ensamblaje primario realizado sobre la versión 84 del Ensembl, empleando Bowtie2 (Langmead and Salzberg 2012) empleando los parámetros por defecto para este tipo de lecturas. Los archivos resultantes del alineamiento (BAM) se separaron e identificaron empleando la aplicación Samtools (Li, Handsaker et al. 2009) y fueron visualizados empleando el interfaz de IGV (Robinson, Thorvaldsdottir et al. 2011).

Las lecturas alineadas se asignaron a genes humanos empleando la función *htseq-count* del paquete HTSeq (Anders, Pyl et al. 2015) con los parámetros por defecto para para lecturas individuales y específicas de banda (reversas). Se añadió la función de los genes completos como característica empleando la versión anotada del Ensembl GRCh84.p5. El contenido diferencial entre las muestras problema y las muestras control fue estimado mediante el paquete DESeq2 (Love, Huber et al. 2014) con los parámetros `cooksCutoff=FALSE`. El valor de P (p-value) fue ajustado mediante el método de estimación del FDR (False Discovery Rate) (Benjamini, Drai et al. 2001).

4. Manipulación y análisis de proteína

4.4 Western Blot

La transferencia de proteínas se realiza empleando membranas de PVDF de

0.45 μ M de tamaño de poro de Millipore (REF: IPVH00010).

Todos los lavados e incubaciones indicadas en este protocolo se realizan a temperatura ambiente. El bloqueo de las membranas se realiza durante 1 hora en PBS 1X al 3% BSA. A continuación se incuban durante 1h en PBS 1X al 0'05% Tween 20 y la concentración de anticuerpo primario indicada en cada caso. Tras la incubación se realizan 3 lavados de 10 minutos con PBS 1X al 0'25% Tween 20. A continuación se incuban con el anticuerpo secundario durante 1 hora. Se realizan de nuevo los 3 lavados de 10 minutos con PBS 1X al 0'25% Tween 20 y se procede al revelado.

Para el revelado se incuba la membrana durante 1-2 minutos en una solución de TRIS 100mM pH 8.5 con 1.25 mM de luminol (Fluka), 225 μ M de ácido cúmarico (Sigma) y 100 ppm de peróxido de hidrógeno.

4.2 Purificación secuencial mediante etiquetas TAP

Las células HEK293T transfectadas con los plásmidos que expresan proteínas fusionadas a la etiqueta TAP se recolectan en PBS 1X y se peletean centrifugándolas 5 minutos a 1,500 rpm. El pellet celular se resuspende en una solución que contiene 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM KCl, 0.1% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM DTT e inhibidores de proteasas (Complete, Roche). Se incuba en hielo 5 minutos y se centrifuga 5 minutos a 4°C y 3,000 rpm para peletear los núcleos. El sobrenadante (extracto citosólico) se

recupera y se suplementa con NaCl a una concentración final de 150 mM. El pellet nuclear se incuba en una solución que contiene 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.4 M NaCl, 10% glicerol, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT e inhibidores de proteasas (Complete, Roche) 30 minutos en hielo, vortexeando ocasionalmente, seguidamente se centrifuga 15 minutos a 15,000 rpm y 4°C. El sobrenadante es el extracto nuclear, que se ajusta a una concentración final de 150 mM NaCl.

A continuación los extractos se incuban con resina de Sefarosa acoplada a IgG (IgG Sepharose 6 Fast Flow, GE Healthcare, #17-0969-01), previamente equilibrada en el buffer IPP150 (10mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% NP40) durante 12 horas a 4°C en una noria.

Seguidamente se centrifuga la resina, se lava 10 veces con 10 volúmenes de IPP150 frío, seguido de otros 5 lavados con 10 volúmenes del buffer de corte por TEV (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 0.1% NP40, 0.5mM EDTA), se deja la resina en 3 volúmenes de este buffer, y se añade DTT hasta 1 mM y proteasa TEV 1/100 (AcTEV Protease, Invitrogen #12575-015). La resina se incuba en una noria a temperatura ambiente entre 2 y 3 horas y se eluye con un pulso de 1 minuto a 13,000 rpm. Se lava la resina 5 veces con 3 volúmenes de Tampón de Unión a Calmodulina (CBB: 10mM β Mercapto Etanol, 10 mM Tris HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 1mM Acetato de Magnesio,

1mM Imidazol, 2mM CaCl₂, 0.1% NP40), y lo que eluye se colecta junto al eluido inicial. El eluido se incuba con la resina de calmodulina (Calmodulin Affinity Resin, Agilent Technologies #214303-52), previamente equilibrada en CBB durante 12h a 4°C en una noria.

Tras la incubación se centrifuga la resina y se lava 10 veces con 10 volúmenes de CBB. Tras eliminar el exceso de CBB se procede a la elución con Buffer de Elución de Calmodulina (10mM β Mercapto Etanol, 10mM Tris HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 1mM Acetato de Magnesio, 1mM Imidazol, 3mM EGTA, 0.1% NP40). La eficiencia y pureza de la preparación se analizan mediante geles PAGE/SDS teñidos con nitrato de plata.

4.3 Purificación mediante colas de Histidina

Las proteínas etiquetadas con Histidinas fueron purificadas por cromatografía de afinidad en resinas *Probond*, siguiendo las recomendaciones del fabricante para purificación en condiciones nativas (que permiten que la proteína pueda ser empleada en ensayos funcionales *a posteriori*). La lisis celular se realiza en una solución hipotónica que contiene 10mM Tris-HCl pH8, 10mM KCl, 0.1% NP-40, 1mM DTT, 1mM PMSF, a 0°C durante 25 minutos, el pellet de DNA se descarta tras 10 minutos de centrifugación a 3,000 rpm y 4°C. La unión de la proteína a la resina se realiza en presencia de 20mM de imidazol; los lavados se realizan a 50mM de imidazol y la elución a 500mM de

imidazol. Para ensayos posteriores la proteína purificada se dializa en una solución de 100mM Tris-HCl pH8, 100mM KCl, 0.5mM EDTA, 0.1% NP-40, 1mM DTT, 1mM PMSF.

4.4 Cromatografías de exclusión por tamaño

Las fracciones nuclear y citoplasmática de células HEK293T se prepararan como se explica en el apartado 5.1, con la diferencia de que, las soluciones de extracción no llevan ni DTT ni glicerol. Los extractos se aplican a una columna de resina *Sephacryl S400* equilibrada en el correspondiente tampón nuclear o citoplasmático sin DTT ni glicerol. Previamente, la columna debe ser calibrada con RNPs de *Influenza* (3–6 mDa) purificadas (Garaigorta, Falcon et al. 2005) cedidas por la Dr. Rocío Coloma, ferritina (480 kDa), catalasa (220 kDa) y BSA (69 kDa), en una relación 1:50 respecto al volumen de la columna. El volumen de exclusión se calibra mediante la adición de azul de dextrano (MW 2,000 mDa), que suele excluirse en las primeras 6 fracciones. El volumen de las columnas utilizadas es de 2,000 µL. Los extractos nuclear y citosólico también se añaden en proporción 1:50 en relación al volumen de la columna, lo cual en términos de proteína supone 1/5 de una p100mm al 100% de confluencia para el extracto citoplasmático y 1/2 de una p100mm para la fracción nuclear. Se recogen fracciones de 40µL hasta cubrir el volumen de la columna, y los complejos son analizados por WB. En los

geles de proteínas se carga un 50% de cada fracción recogida.

4.5 Tinción de geles con nitrato de plata

Para esta técnica se preparan geles convencionales PAGE/SDS de 0.75 mm de grosor y todo el proceso abajo indicado se realiza a temperatura ambiente.

Una vez se ha resuelto el gel, éste se fija en una solución al 25% Etanol y 10% de Ácido Acético, durante 1 hora en un balancín. A continuación se trata durante 3 minutos con una solución al 1% de Ácido Nítrico, seguido de 30 minutos con la solución sensibilizante (30% Etanol, 0.2% peso en volumen (w/v) de Tiosulfato Sódico Pentahidratado, 6.8% w/v de Acetato Sódico). Se realizan 3 lavados de 5 minutos con agua y se añade la solución de nitrato de plata (0.25% w/v de Nitrato de Plata en Agua) durante 40 minutos, agitándola en un balancín. Se realizan dos lavados de 1 minuto con agua. Una vez lavado, se añade solución de revelado (2.96% w/v de carbonato sódico con 0.2mg/mL de Formaldehído, preparada en agua). Se espera a que se revelen las bandas y se detiene la reacción incubando el gel unos 10 minutos en una solución al 10% de acético.

4.6 Geles Nativos de Proteína.

Los geles no desnaturizantes, o geles nativos de proteínas se elaboran con las mezclas habituales para PAGE-SDS pero en ausencia de SDS. Los empleados en este

trabajo se prepararon en gradientes del 4 al 20% con un gradintero. La separación se realiza durante toda la noche a 4°C y 80 voltios.

El tampón de carga para genes nativos lleva 100mM Tris-HCl pH 8, 40% (v/v) Glicerol y 0,5% (w/v) Serva Blue. El tampón del cátodo contiene 100mM L-Histidina y 0,002% *Serva Blue*, ajustado a pH 8 con Tris-Base 1M. La solución del ánodo contiene 100 mM Tris-HCl a pH 8.8. Para el marcador de pesos moleculares se utilizó Tiroglobulina, Ferritina, Catalasa y Albúmina de Suero Bovino (BSA). Los geles se transfieren a membranas de PVDF en una tampón de Tris-Glicina con un 20% de metanol y se analizan por Western Blot.

4.7 Inmunoprecipitación

A las células HEK293T se les añade TNE 1X frío y se centrifugan a 1,500 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se resuspende en una solución que contiene TNE 1X, 0.2% NP40 e inhibidores de proteasas. Tras una incubación de 30 minutos en hielo se centrifugan 5 minutos a 3,000 rpm. El sobrenadante se incuba con los distintos anticuerpos a estudiar durante toda la noche a 4°C en una noria. Seguidamente se incuba el extracto con 100 µL de resina de sefarosa acoplada a proteína A o a proteína G en función del origen del anticuerpo primario, y se incuban durante al menos 2 horas en la noria a 4°C. A continuación se realizan 10 lavados con buffer de lavado de inmunoprecipitación (50mM Tris-HCl pH 8,

100mM NaCl, 0'2 mM EDTA, 0'5 % TX-100, 0'5mM DTT). Tras el último lavado, se retira el sobrenadante y se añade a la resina buffer de ruptura 2X para geles de proteínas. Los resultados se analizan por PAGE-SDS seguido de Western Blot.

4.8 Espectrometría de masas

4.8.1 Identificación de proteínas mediante análisis MALDI-TOF-TOF:

Los datos de identificación de las muestras fueron adquiridos en un espectrómetro de masas Abi 4800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA), en modo reflector de iones positivos, y los espectros obtenidos fueron almacenados en el programa de almacenamiento y manejo propio del dispositivo (Abi 4000 Series Explorer Spot Set Manager). Cada espectro de los fragmentos peptídicos (PMF, Peptide Mass Fingerprinting) fue calibrado internamente mediante las señales de masa resultantes de la autólisis de la tripsina, hasta alcanzar una precisión inferior a 25 ppm. Las señales de masa conocidas para la tripsina y la queratina, al igual que las posibles masas añadidas por residuos de sodio y potasio (+21 Da y +39 Da) fueron eliminadas de la lista de picos del espectro de masas.

Se cotejaron las secuencias en la base de datos de proteínas no redundantes de NCBI antes de procesarlas en el programa de MASCOT v 2.2.04 (Matrix Science, London, UK).

El intervalo de credibilidad para la identificación de lecturas fue fijado a $\geq 95\%$ ($p < 0.05$), y tan solo se tuvieron en consideración los péptidos con una puntuación mayor que dicho umbral de identificación.

4.8.2 Preparación de las muestras para LC-MS/MS (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem)

Las muestras de compartimentos nucleares y citoplasmáticos fueron purificadas mediante purificación vía la etiqueta TAP como se ha explicado anteriormente. Las muestras fueron sometidas a precipitación mediante metanol-cloroformo para aislar las proteínas y eliminar posibles sustancias que pudieran interferir el proceso de LC-MS/MS. Los extractos proteicos resultantes fueron disueltos en 20 μ l de 50 mM TEAB/ 50% TFE, reducido con 10 mM de TCEP, y alquilado mediante la adición de un agente de bloqueo de cisteínas. MMTS. Las muestras fueron diluídas hasta 200 μ l con 50 mM TEAB y digeridas con tripsina en un ratio 20:1 (enzima:proteína) durante 12h a 37°C. Para la purificación de las mezclas trípticas, las muestras se secaron y se re-disolvieron en 40 μ l de 0.2% ácido trifluoroacético en agua, utilizando puntas de alta capacidad OMIX C18 (Agilent).

4.8.3 Identificación de proteínas mediante análisis LC-MS/MS

Las muestras peptídicas fueron analizadas en un sistema de cromatografía líquida (Eksigent Technologies nanoLC Ultra

1D plus, AB SCIEX, Foster City, CA) acoplado a un espectrómetro de masas Tripe TOF 5600 (AB SCIEX, Foster City, CA) con una fuente de iones en nanoelectrospray. Como columna analítica se utilizó una columna de sílica de fase reversa del tipo Chrom XP C18 75 μm \times 15 cm, con un tamaño de partícula de 3 μm y 120 Å de tamaño de poro (Eksigent, AB SCIEX). Como trampa se utilizó una columna tipo Chrom XP C18 350 μm \times 0.5 mm (Eksigent, AB SCIEX), de 3 μm de tamaño de partícula y 120 Å de tamaño de poro, que se intercambió con la columna analítica tras un tiempo de carga de 1 minuto. La bomba cargaba una solución del 0.1% de ácido fórmico en agua a 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. La nano-bomba proveía de un ratio de flujo de 300 nl/min y operaba bajo condiciones de elución de gradiente utilizando como fase móvil A una solución del 0.1% de ácido fórmico en agua, y como fase móvil B 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo, pasando de un 2% a un 40% de B en 100 minutos. El volumen de inyección fue de 5 μl .

El espectrómetro de masas operó en modo de adquisición de datos independiente. Para los análisis del tiempo de vuelo, el tiempo de acumulación se fijó a 0.250008 s, y el rango de masas entre 350–1250 Da. Los péptidos de 2 a 5 cargas y las señales por encima de 100 cuentas por segundo se seleccionaron para su fragmentación. La identificación de los iones producidos se realizó con un tiempo de acumulación de 0.250008 s, y rango de tamaños de 100–2,000 Da, en modo de alta sensibilidad. El

ciclo total tuvo una duración de 4.05 s. Para prevenir contaminación cruzada, entre muestras se inyectaron dos muestras vacías.

Los datos obtenidos para cada muestra fueron procesados utilizando el programa “*Analyst TF 1.5.1*” (AB SCIEX, Foster City, CA). Los datos crudos se transformaron al tipo de archivo general para MASCOT (.mgf) y se lanzaron contra la base de datos humana de UniProtKB/Swiss-Prot (versión del 31 de Octubre de 2012, 2012_10) con el programa Server v. 2.4 (Matrix Science, London, U.K.). La base de datos empleada contiene 36962 proteínas y sus correspondientes secuencias reversas. Los parámetros de búsqueda se configuraron del modo siguiente: modificación fija, metil-tiocisteína; modificación variable: metioninas oxidadas; tolerancia de la masa peptídica, 50 ppm y 0.5 Da; permisividad de 1 corte fallido. La tasa de descubrimiento de falsos positivos (False Discovery Rate; FDR < 1%) se calculó manualmente como se indica a continuación: tras la búsqueda en la base de datos, las identificaciones se ordenaron de acuerdo a sus puntuaciones obtenidas por el MASCOT. Esta lista contenía tanto secuencias de proteínas anversas y reversas. A continuación se elaboró una sub-lista conteniendo solo un 1% de las secuencias reversas y se utilizó para los análisis finales de identificación de proteínas acompañantes a la proteína diana, hCLE.

5. Técnicas de imagen

5.1 Inmunofluorescencias

La fijación de las células al cubreobjetos se realizó mediante dos métodos diferentes.

- a) Metanol: lavado con PBS 1X seguido de 20 minutos en 80% Metanol a -20°C.
- b) Formaldehído: lavado con PBS 1X seguido de 30 minutos en 4% de Formaldehído con 4% Sacarosa, a temperatura ambiente.

La permeabilización de la membrana celular, requerida en el proceso de fijación con formaldehído, se realiza añadiendo 50µL por cubreobjetos de PBS 1X con 0'5% TX100 durante 5 minutos a temperatura ambiente. El proceso de fijación con metanol no requiere permeabilización.

El bloqueo de los antígenos inespecíficos se realiza tratando las células con PBS 1X con 1% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. A esta solución de bloqueo se le añade 0'1% de TX100 en las células fijadas con Formaldehído.

La incubación con el anticuerpo primario se realiza durante 1 hora a temperatura ambiente, con una solución que contiene PBS 1X, 0'1% BSA y la concentración adecuada de anticuerpo primario.

La incubación con el anticuerpo secundario se realiza durante 1 hora a temperatura ambiente, con la misma

solución empleada para los anticuerpos primarios y la cantidad recomendada de anticuerpo secundario y/o DAPI.

El montaje de las muestras se realiza en PROLONG Gold, durante al menos 12h a temperatura ambiente.

5.2 Fotoactivación y seguimiento de proteína

Células HEK293T fueron transfectadas con el plásmido pHLE-PAGFP y 24 horas después, se usaron para microscopía *in vivo* en un dispositivo Leica TCS SP5. PAGFP presenta unos bajos niveles de fluorescencia en condiciones de no fotoactivación, pero cuando un láser de 405 nm incide sobre ella devuelve un pico de emisión de alta intensidad a 488 nm. Para la fotoactivación se utilizó un diodo azul de 50 mW al 80% de potencia emitiendo a 405 nm sobre las zonas de interés, de 2 µm de diámetro, empleando la función de fotoblanqueo del programa del microscopio (LAS AF). La línea del láser de argón de 488 nm para la recogida de la señal se empleó a muy baja intensidad (4%) para evitar el fotoblanqueo de la muestra, que no se observó durante el experimento. Los vídeos fueron analizados con el programa Leica Microsystems LAS AF (versión 2.3.0).

6. Ensayos funcionales

6.1 Ensayos de unión a resinas de análogos de cap

Los experimentos de unión a resinas de análogo de 5' cap se realizaron empleando la resina sefarosa 4B – 7metil-GTP de GE-Healthcare (#27-5025-01) y como control, resina sefarosa 4B vacía de Sigma (#9012-36-6).

Extractos de proteína de células HEK293T, cultivos primarios neuronales o preparaciones de sinaptosomas fueron procesados en una solución que contenía 10mM Tris-HCl pH8, 100mM KCl, 0.5mM EDTA, 0.1% NP-40, 1mM DTT, 1mM PMSF (solución CIT-TAP) en presencia o ausencia de competidores del análogo de 5' cap en función de los requerimientos del experimento. Las preparaciones de tejidos, al estar preparadas en otro tipo de tampones fueron diluídas 1:10 en la solución arriba indicada. La incubación con las resinas se realizó durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación, las resinas se lavaron en un tampón que contenía 10mM Tris-HCl pH8, 0.5mM DTT, 0.2mM EDTA, 100mM NaCl, 0.5% TX-100. Tras los lavados las resinas fueron eluídas con distintos competidores diluídos en la solución CIT-TAP o tratadas directamente con solución de carga de geles PAGE-SDS precalentada a 100°C. Las relaciones entre los extractos totales (Ext.Tot) y la cantidad de proteína unida a las resinas (unión) Ext.Tot:Unión fueron: 1:12 en

extractos totales y citoplasmáticos de células HEK293T; 1:6 en extractos nucleares de células HEK293T; 1:30 de hCLE purificada por la etiqueta de Poli-Histidinas; 1:12 en cultivos primarios de neuronas y 1:20 de los extractos citoplasmáticos y sinaptosomales del tejido cerebral.

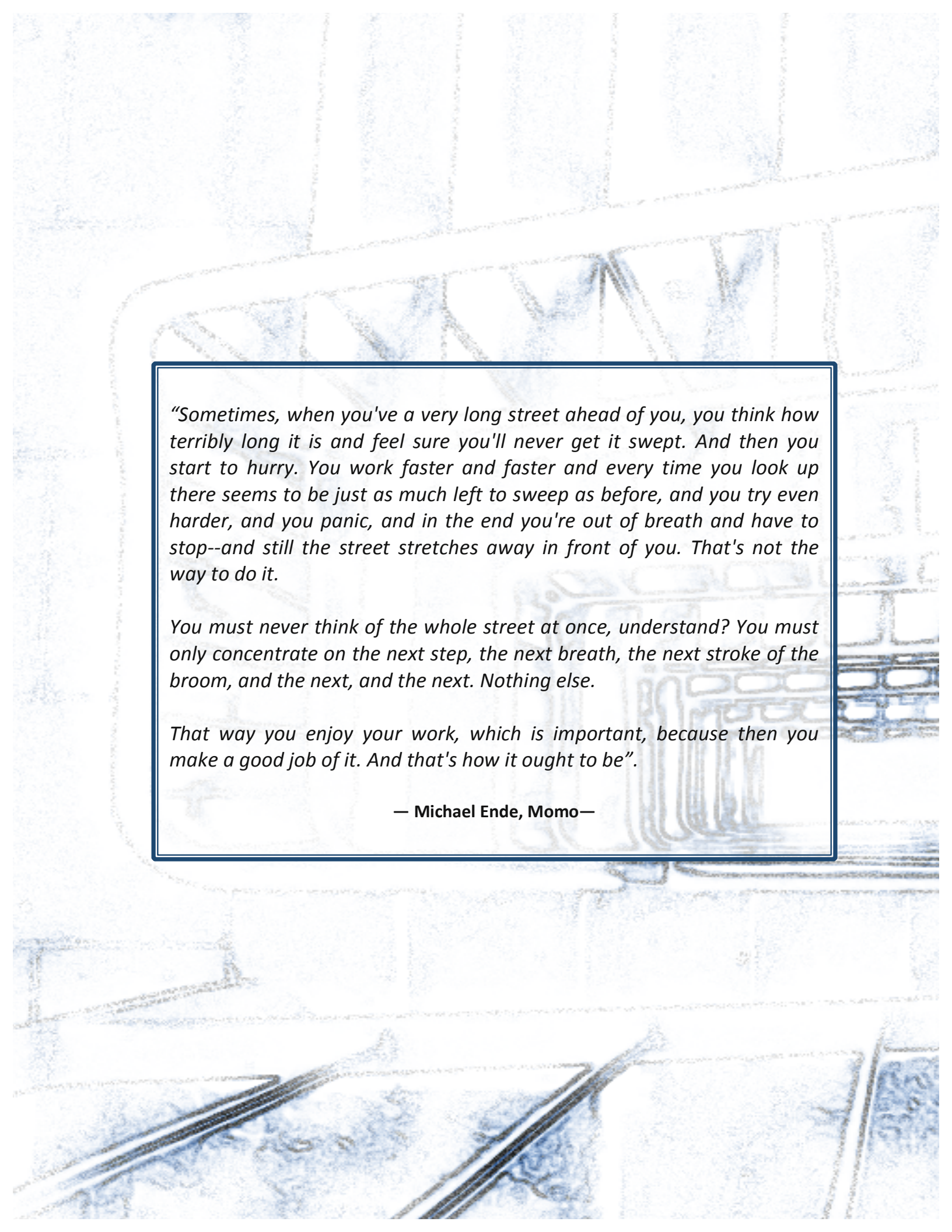
6.2 Marcaje Metabólico

Se utilizaron células HEK293T silenciadas o no con el lentivirus expresando el shRNA dirigido contra hCLE y seleccionadas previamente con puromicina. Tras 5 días en medio selectivo, las células fueron tratadas con diferentes condiciones (ActD, 1.5µg/µL; DRB 100µM, inhibidor de RNAPIII 80 µM), en un medio DMEM deplecionado de Metionina y Cisteína (DMEM -Cys/-Met) durante 30 minutos. Después de este tiempo, se añadió un medio DMEM -Cys/-Met suplementado con una mezcla de Metionina y Cisteína marcadas con el radioisótopo de azufre S³² a 50µCi/mL. La marca permaneció en el medio hasta el final del experimento. Las muestras se recogieron a distintos tiempos tras la adición de los aminoácidos marcados y fueron lisadas en buffer de ruptura de geles PAGE-SDS. El análisis se realizó mediante geles PAGE-SDS secados y expuestos a pantallas para un dispositivo tipo *Phosphorimager*.

Para los experimentos de marcaje con Luciferasa, células HEK293T silenciadas o control fueron transfectadas con un plásmido de expresión de la proteína Luciferasa *Firefly* bajo el promotor de CMV. A las 12 horas

después de la transfección las células fueron tratadas con distintas drogas (ActD, 1.5µg/µL; DRB, 100µM; inhibidor de RNAPIII, 80 µM) y se recogieron a distintos tiempos post-tratamiento lisándolas en una solución hipotónica que contenía 10mM Tris-HCl pH8,

100mM KCl, 0.5mM EDTA, 0.1% NP-40, 1mM DTT, 1mM PMSF. La proteína total extraída fue analizada de acuerdo a los niveles de expresión de Luciferasa en un dispositivo luminométrico de tipo *Appliskan*, de *Thermo Scientific*.



"Sometimes, when you've a very long street ahead of you, you think how terribly long it is and feel sure you'll never get it swept. And then you start to hurry. You work faster and faster and every time you look up there seems to be just as much left to sweep as before, and you try even harder, and you panic, and in the end you're out of breath and have to stop--and still the street stretches away in front of you. That's not the way to do it.

You must never think of the whole street at once, understand? You must only concentrate on the next step, the next breath, the next stroke of the broom, and the next, and the next. Nothing else.

That way you enjoy your work, which is important, because then you make a good job of it. And that's how it ought to be".

— Michael Ende, Momo—

1. Presencia de hCLE en líneas celulares

Estudios anteriores empleando el sistema de doble híbrido en levadura mostraron que hCLE interacciona consigo misma (Howng, Hsu et al. 2004). Experimentos de nuestro laboratorio empleando extractos celulares para la detección del hCLE por Western Blot mostraron un patrón de migración anómala de hCLE en geles desnaturalizantes de acrilamida-SDS (PAGE-SDS) en relación al peso molecular predicho para hCLE (28 kDa). Uno de los objetivos de esta primera fase del proyecto fue corroborar la capacidad de hCLE de asociarse consigo misma en células HEK293T. Además, queríamos analizar la posible presencia de hCLE en complejos de mayor tamaño, compatibles con gránulos de mRNPs, en los cuales hCLE había sido identificada en estudios previos.

1.1 hCLE forma dímeros resistentes a condiciones desnaturalizantes

Al analizar hCLE en geles PAGE-SDS se observaba reactividad frente a anticuerpos anti-hCLE correspondientes a tamaños de 26 kDa, 50 kDa y en torno 65kDa (**Figura 3 A, panel izquierdo**). La banda inferior era compatible con el monómero de hCLE, y las bandas superiores podrían ser una reacción inespecífica del anticuerpo de hCLE o un dímero y trímero de hCLE resistentes a condiciones de desnaturalización. Cabe destacar que este patrón de triple banda de los anticuerpos anti-hCLE puede observarse

con tres anticuerpos policlonales dirigidos contra regiones distintas de la secuencia de hCLE, lo que sugiere que se tratan de oligómeros de hCLE. No obstante quisimos realizar un análisis más exhaustivo de la naturaleza de todas las bandas reactivas al anticuerpo. En primer lugar, analizamos el tamaño de hCLE en geles nativos (**Figura 3 A, panel derecho**). En estas condiciones la banda de menor tamaño reactiva al anticuerpo de hCLE tenía aproximadamente 50 KDa, lo que podría corresponder a un dímero de hCLE. Además se observaron bandas reactivas de tamaños superiores (200 kDa y 400 kDa aproximadamente). Sin embargo, bandas correspondientes al tamaño del monómero no eran detectables. Estos resultados indican que hCLE está presente en complejos de proteínas y que el tamaño molecular mínimo de dichos complejos corresponde, probablemente a dímeros hCLE-hCLE.

Como la banda de 50 kDa podría surgir de la interacción de hCLE con alguna otra proteína de un peso molecular similar, se expresó y purificó hCLE fusionado a la etiqueta TAP en el dominio carboxi-terminal (pChCLE-TAP) en células HEK293T. El resultado de la purificación es la proteína hCLE unida a un pequeño dominio de 4kDa requerido para el paso final de la purificación por TAP, denominado “Dominio de Unión a Calmodulina” (CBD). A partir de este momento, a la proteína hCLE resultante de una purificación completa por el protocolo de TAP se la referirá como hCLE-CBD. La hCLE-

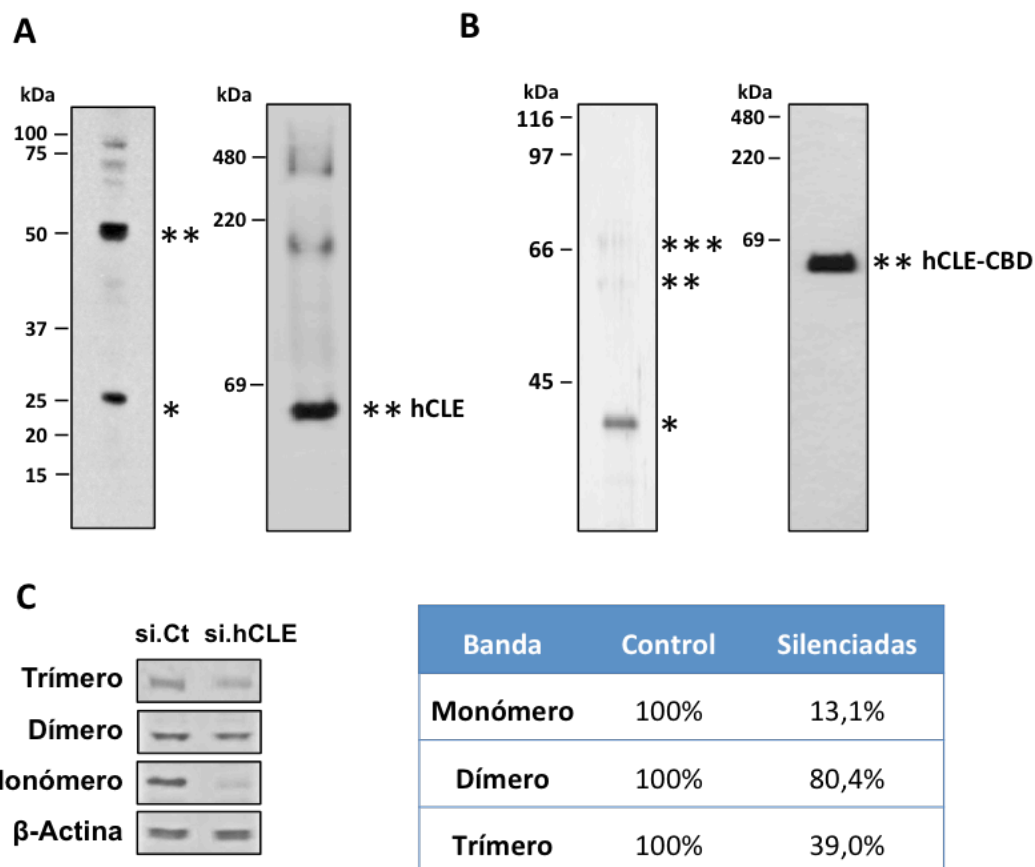


Figura 3: hCLE forma multímeros que son resistentes a condiciones desnaturalizantes,

(A); Western Blot contra hCLE de extractos totales de HEK293T usando condiciones desnaturalizantes (izquierda) o condiciones nativas no desnaturalizantes (derecha). **(B);** Proteína hCLE-CBD purificada y analizada mediante un gel desnaturalizante de tinción en plata (izquierda). Proteína hCLE-CBD analizada en geles nativos y revelada por *Western blot* (derecha). **(C);** Células HEK293T infectadas con lentivirus control o lentivirus que silencian hCLE. La sensibilidad al silenciamiento de las distintas bandas reactivas para hCLE fue analizado mediante *Western blot* (panel superior) seguido de una cuantificación con el programa *Image-J*, cuyos valores se indican en el panel de la izquierda.

CBD resultante de la purificación se analizó por PAGE-SDS revelado por tinción de plata, donde se encontró una banda de unos 30 kDa de tamaño que correspondería al monómero de hCLE-CBD. También se observaron bandas de baja intensidad de tamaños aproximados de 55 kDa y 70 kDa (**Figura 3 B, panel izquierdo**). A continuación hCLE-CBD se analizó en geles nativos y se observó una banda mayoritaria en el tamaño de 55 kDa, que corresponde al dímero de hCLE-CBD,

indicando que hCLE puede formar dímeros consigo misma (**Figura 3 B, panel derecho**).

Para confirmar la existencia de una fracción de dímero de hCLE y posible trímero resistentes a condiciones desnaturalizantes, se cortaron todas las bandas visibles en torno a 30, 55 y 70kDa en el ensayo de PAGE-SDS y tinción de plata y se analizaron por espectrometría de masas utilizando la tecnología MALDI-TOF/TOF.

Este ensayo confirmó que las bandas de 30, 55 y 70 kDa eran hCLE (**Tabla 1**) ,

Tabla 1: Identificación de multímeros de hCLE por métodos proteómicos

MW (banda)	Nombre de la proteína	Número de Acceso	MW	Pept (MS[MSMS])	Score	Seq.Cov
65kDa	hCLE/c14orf166	gi 55613379	28066	19(5)	207	74
48kDa	hCLE/c14orf166	gi 55613379	28066	14(1)	150	45.4
27kDa	hCLE/c14orf166	gi 55613379	28066	11	135	42.6

MW (banda): Peso molecular observado de la banda analizada. **Nombre de proteína:** nombre anotado de la proteína identificada mediante el análisis espectrofotométrico. **Número de acceso:** numero de acceso a la proteína identificada en la base de datos de proteínas NCBI (non-identical NCBI protein database). **MW:** peso molecular nominal de la proteína identificada. **Pept (MS[MSMS]):** número de péptidos emparejados desde la identificación más alta de la proteína en el análisis de huella peptídica y, entre paréntesis, número de espectros MS/MS que han sido emparejados con esta proteína. **Score:** puntuación de la proteína por Mascot. Este número refleja las puntuaciones combinadas de todos los espectros de masas que se han emparejado con las secuencias de aminoácidos contenidas en dicha proteína. Una mayor puntuación implica un emparejamiento más fiable. **Seq. Cov.:** porcentaje de la secuencia de proteína según la base de datos, cubierta por los péptidos identificados y emparejados con dicha proteína.

Tabla 1: Identificación de multímeros de hCLE por métodos proteómicos: la proteína hCLE-CBD purificada fue analizada en un gel del plata desnaturalizante y las bandas mayoritarias que se presentaban en tamaños moleculares correspondientes al hipotético monómero, dímero y trímero fueron extraídas y sometidas a análisis proteómico.

indicando que hCLE es capaz de formar dímeros y trímeros que son resistentes a condiciones de desnaturalización. Cabe recordar que, como ya se ha mencionado, el dominio CBD aporta unos 4 kDa de tamaño a la proteína silvestre, lo que implica que los tamaños de estas bandas recién identificadas en hCLE-CBD, en la proteína silvestre equivaldrían a las bandas observables en torno a 27, 50 y 65 kDa (**Figura 3 A, panel izquierdo**).

Paralelamente, efectuamos un silenciamiento del hCLE endógeno empleando lentivirus de expresión de shRNAs contra la secuencia del mensajero de hCLE, y

analizamos el resultado por PAGE-SDS (**Figura 3 C panel izquierdo**).

Los datos mostraron que, mientras que el silenciamiento de la banda del monómero de hCLE es muy sensible al silenciador empleado, el trímero es algo más resistente al silenciamiento y el dímero muestra una resistencia muy elevada al silenciamiento (**Figura 3C, panel derecho**). Esto podría indicar que el dímero de hCLE resistente a desnaturalización es un complejo muy estable o especialmente seleccionado por la célula.

En conjunto, estos datos muestran que hCLE, en condiciones fisiológicas, está

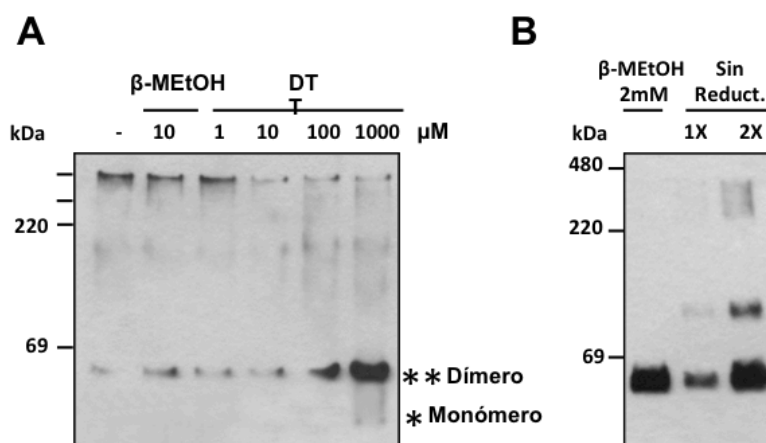


FIGURA 4: hCLE forma multicomplejos sensibles a condiciones desnaturizantes.

(A); Gel nativo de extractos totales de células HEK293T tratados con concentraciones crecientes de agentes reductores, y revelado contra hCLE. **(B);** hCLE-CBD purificada en presencia y ausencia de agentes reductores. Para facilitar la visualización de las bandas de mayor tamaño de la muestra en ausencia de agentes reductores se cargó una cantidad equivalente a la del control en presencia de agentes reductores (1X), y el doble de dicha cantidad (2X).

presente en complejos de distintos tamaños, pudiendo el menor de ellos corresponder a un dímero hCLE-hCLE, aunque también son visibles complejos de tamaños muy superiores. También muestran que parte de estos dímeros y trímeros son resistentes a condiciones desnaturizantes, lo que sugiere que poseen una estructura altamente compacta y estable. Además, la sensibilidad al silenciador varía en función del tipo de estructura que esté formando hCLE, lo cual apoya la idea de que dicha estructura afecta a la estabilidad intracelular del complejo y podría estar diferencialmente seleccionada por la célula.

1.2 hCLE forma supercomplejos multiproteicos sensibles a condiciones desnaturizantes

Aunque habíamos confirmado la existencia de dímeros y trímeros de hCLE

resistentes a condiciones desnaturizantes, no sabíamos nada acerca de la naturaleza de los complejos de mayor tamaño observados en los geles nativos del hCLE endógeno, que en este caso sí resultaban sensibles a condiciones de desnaturización. Para ello, primero analizamos, en geles nativos, la presencia de estos complejos utilizando extractos totales de células HEK293T en concentraciones crecientes de agentes reductores (**Figura 4 A**). Se puede observar que a medida que aumenta la concentración de agentes reductores, disminuye la cantidad de complejos de alto peso molecular y aumentan los niveles de dímero de hCLE.

La disminución en la cantidad de complejos de alto peso molecular visibles en el gel no justifica el enorme aumento en los niveles de dímero, lo que sugiere que el reservorio de hCLE se encuentra en complejos de tamaño

superior a 660 kDa, que son demasiado grandes como para entrar en el retículo de los geles de poliacrilamida.

Dada la capacidad de oligomerización intrínseca de hCLE, nos preguntamos si la proteína purificada podría formar complejos de alto peso molecular. Para ello, obtuvimos hCLE-CBD (proceso que se finaliza a 2mM de β -MEtOH), y parte de la purificación fue dializada en el mismo buffer en ausencia de agentes reductores. Los efectos de los agentes reductores sobre la formación de complejos de hCLE-CBD fueron analizados mediante un gel nativo (Figura 4 B). Los resultados muestran que hCLE-CBD, purificada a homogeneidad, es capaz de re-ensamblarse en complejos de alto peso molecular si eliminamos los agentes reductores del medio. Este comportamiento se observa en algunas proteínas que se encuentran en gránulos de mRNA deneuronas, y se cree que facilita una rápida dinámica en la formación de dichos gránulos importante para sus funciones (Han, Kato et al. 2012, Kato, Han et al. 2012).

1.3 El dímero de hCLE resistente a desnaturalización se genera a través de la zona de hélice superenrollada

Normalmente, los dímeros de proteínas resistentes a condiciones desnaturalizantes se forman mediante la interacción de dominios de hélice superenrollada, que establecen interacciones muy fuertes y difíciles de romper. En

ocasiones la dimerización se evita por efecto de cambios estructurales de la proteína que internalizan dicha zona y la hacen inaccesible para la dimerización.

hCLE posee una zona de este tipo en la región carboxi-terminal, fácilmente identificable mediante programas de predicción de zonas de hélice superenrollada (Figura 5 A), en concreto, los programas de predicción consideran que la mayor probabilidad de formación de una estructura de este tipo se encuentra entre los residuos 208 y 225 de la secuencia peptídica de hCLE. Para confirmar que en el caso de hCLE el dímero resistente se forma a través de esta zona, generamos unos vectores que expresaban solo las zonas amino terminal o carboxi terminal de hCLE (residuos 1-120 y 120-244 respectivamente). Sobreexpresamos dichos vectores en células HEK293T y utilizamos extractos totales para su análisis por PAGE-SDS, seguidos de ensayos de WB con anticuerpos policlonales diseñados contra una zona central de la proteína, parcialmente contenida en ambas construcciones (Figura 5 B). Pudimos observar que la proteína que contiene el dominio amino-terminal migraba en el rango de tamaño esperado, en torno a los 15 kDa. Sin embargo, la proteína que contiene el dominio carboxi-terminal migraba en un rango de tamaño anómalo, correspondiente a los 25 kDa, lo cual era compatible con una dimerización de dicha zona.

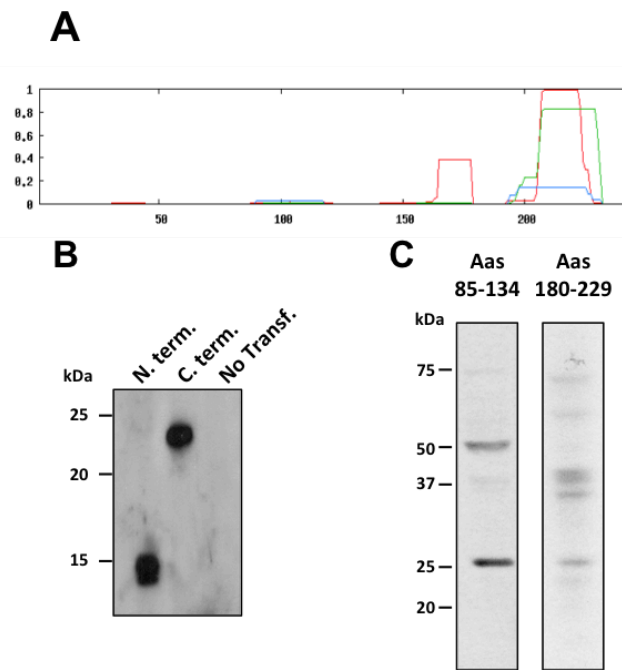


FIGURA 5: hCLE dimeriza por el dominio que contiene la región de hélice superenrollada.

(A); Representación gráfica de las zonas con mayor probabilidad de conformar regiones de hélice superenrollada en la secuencia peptídica de hCLE, predicha mediante la aplicación del servidor “Coils” de ExPASy (www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html). (B); Extractos totales de células HEK293T transfectadas con construcciones expresando el dominio amino terminal (aminoácidos del 1-120) y el carboxi terminal (aminoácidos 120-244) de hCLE fueron analizados por Western Blot de geles desnaturalizantes usando un anticuerpo de hCLE dirigido contra la zona central de la proteína, identificando ambas regiones. (C); extractos totales de células HEK293T fueron analizados en geles desnaturalizantes de proteínas y revelados mediante distintos anticuerpos policlonales dirigidos contra la zona central de la proteína, aminoácidos (Aas) 85-134 (panel izquierdo) y la zona carboxi-terminal de la proteína, Aas 180-229 (panel derecho).

Generalmente, las zonas de interacción de hélices super-enrolladas presentan una estructura tan compacta que los anticuerpos dirigidos contra las mismas las detectan con más dificultad de lo habitual. Quisimos analizar si, en el caso del dímero de hCLE, un anticuerpo dirigido contra la región de dimerización mostraba menor eficiencia para detectar hCLE en condiciones de no sobreexpresión. Para ello analizamos el hCLE endógeno por WB empleando dos anticuerpos policlonales distintos. El primero (Figura 5 C, panel izquierdo) dirigido contra

la región central de hCLE, sin llegar a la zona predicha de hélice superenrollada. El segundo (Figura 5 C, panel derecho) dirigido contra la zona carboxi-terminal de hCLE, conteniendo toda la región de hélice superenrollada y algunos residuos de las regiones circundantes. Los resultados muestran que en efecto, el anticuerpo dirigido contra la zona carboxi-terminal de hCLE tiene más dificultades para detectar el dímero de hCLE que el anticuerpo dirigido contra la zona central, lo cual es compatible con la idea de que la dimerización resistente a condiciones

desnaturalizantes se produce a través de la zona de hélice superenrollada de la región carboxi-terminal de hCLE. Este dato, sin embargo, no descarta que hCLE pueda dimerizar por otras zonas de su secuencia de aminoácidos.

2. Caracterización de los complejos de hCLE

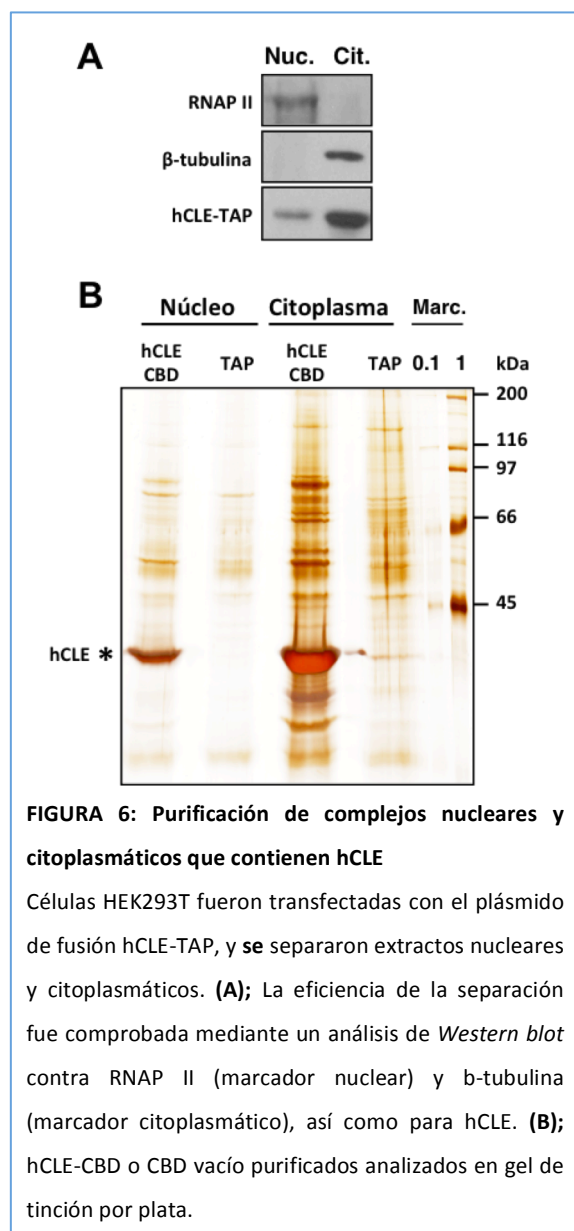
Como ya se ha mostrado, en condiciones nativas hCLE está presente en complejos de alto peso molecular, posiblemente interactuando con distintas proteínas importantes para la realización de su función endógena. Por esta razón el siguiente objetivo consistió en identificar, mediante análisis proteómico, las proteínas que se asocian a hCLE con mayor eficacia en distintos compartimentos celulares y validar dichos resultados mediante el análisis bioquímico de los complejos.

2.1 hCLE interacciona con proteínas acompañantes comunes en el núcleo y en el citoplasma.

Para identificar las proteínas asociadas a hCLE se realizó una purificación por TAP de hCLE separando extractos nucleares de los citoplasmáticos de células HEK293T, en condiciones lo suficientemente suaves como para conservar las interacciones moleculares. Para asegurar que esta separación había sido correcta, se analizaron los extractos con anticuerpos que reconocen un marcador nuclear (RNA Polimerasa II Celular, RNAP II) y un marcador

citoplasmático (β -tubulina) (Figura 6 A). A continuación, se comprobó la eficiencia de la purificación mediante un gel de plata (Figura 6 B) que mostró que hCLE estaba muy enriquecida y estaba acompañada bandas adicionales correspondientes a las formas multiméricas de hCLE y proteínas asociadas.

A continuación, las muestras nucleares y citoplasmáticas de hCLE-CBD y TAP vacío fueron digeridas con tripsina y los péptidos tripticos resultantes se analizaron mediante un sistema de cromatografía



líquida acoplado a un espectrómetro de masas triple-TOF, como se detalla en materiales y métodos. Para estimar la certeza de la identificación peptídica se calculó la tasa de identificación de falsos positivos (FDR), y los péptidos con una FDR > 1% fueron desestimados para el análisis. Tan solo las proteínas que se identificaban por al menos 2 péptidos no redundantes, fueron consideradas en el análisis. Esto dio como resultado la [Tabla 1](#) donde se incluyen las proteínas que solo están presentes en las muestras de hCLE-TAP, y aquellas que, estando también presentes en el control se encuentran enriquecidas al menos 3 veces más en las muestras de hCLE-TAP (marcadas con un asterisco), lo que supone un aumento de al menos 3 veces en la puntuación otorgada por el análisis del sistema MASCOT. La mayor puntuación del MASCOT es, como era de esperar, hCLE, tanto en las fracciones nucleares como en las fracciones citoplasmáticas.

De entre las proteínas identificadas en el núcleo asociadas a hCLE, aquellas relacionadas con la transcripción y el procesamiento del mRNA son las más abundantes. También se observó la presencia de proteínas implicadas en el transporte núcleo-citoplasmático y proteínas relacionadas con motores moleculares. Otras proteínas, asociadas a proliferación celular y traducción de proteínas también fueron identificadas ([Tabla 2](#)).

De entre las proteínas asociadas a hCLE en el citoplasma, aquellas relacionadas

funcionalmente con la transcripción del mRNA, su procesamiento y transporte, fueron las más abundantes, junto con proteínas relacionadas con motores moleculares y citoesqueleto. También se detectaron proteínas implicadas en traducción ([Tabla 3](#)).

Cabe destacar que se identificaron ciertas proteínas comunes en ambos compartimentos celulares, como DDX1 (una RNA helicasa dependiente de ATP), HSPC117 (una RNA ligasa dependiente de GTP), Fam98B y Fam98A (proteínas de función desconocida) o la quinasa de la cadena ligera de la miosina II. A partir de este momento, nos centramos en el estudio de proteínas asociadas a hCLE tanto en el núcleo como en el citoplasma que habían obtenido buenas puntuaciones en la identificación proteómica, que eran: DDX1, HSPC117 y Fam98B.

2.2 Los acompañantes comunes en núcleo y citoplasma están presentes en complejos junto al hCLE endógeno, y sus interacciones dependen parcialmente de RNA.

Los datos de proteómica mostraron la composición de los complejos de proteínas asociados a hCLE purificada. El siguiente paso consistió en analizar si esta información se puede corroborar con la hCLE endógena. Para ello se prepararon extractos nucleares y citoplasmáticos de células HEK293T y a continuación fueron analizados en columnas de cromatografía de exclusión por tamaño en resinas Sephadex S-400. Muchas de las proteínas identificadas como asociadas a

Tabla 2: Proteínas asociadas a hCLE en el núcleo

Funciones	Nombre de la proteína	Número de acceso UniProtKB/ Swiss-Prot	MW (Da)	Péptidos identificados (no-redundantes) hCLE-CBD	Puntuación hCLE-CBD
Factores de transcripción y proteínas relacionadas	<i>5'-3' exoribonuclease 2</i>	Q9H0D6	109249	2(1)	70
	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3</i>	P51991	39755	1(1)	67
	<i>F-box-like/WD repeat-containing protein</i>	Q9BQ87	57158	1(1)	64
	<i>Transcription elongation factor SPT6 (SPT6)</i>	Q7KZ85	199960	1(1)	60
	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein DO (hnRNP DO)</i>	Q14103	38548	1(1)	59
	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2</i>	P07910	33696	1(1)	51
	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 3A (ARI3A)</i>	Q99856	62896	1(1)	49
	<i>LIM domain-binding protein 1</i>	Q86U70	47008	1(1)	46
Factores de splicing	<i>Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1</i>	Q6UN15	66579	1(1)	93
	<i>Pre-mRNA-processing factor 19</i>	Q9UMS4	55514	1(1)	71
	<i>Small nuc. ribonucleoprotein-associated proteins B and B'</i>	P14678	24732	1(1)	55
	<i>Pre-mRNA-processing-splicing factor 8</i>	Q6P2Q9	274484	1(1)	49
	<i>RNA-binding protein 25</i>	P49756	100400	1(1)	46
	<i>U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4</i>	O43172	58964	1(1)	45
	<i>Splicing factor 3B subunit 2</i>	Q13435	100257	1(1)	43
Proteínas motoras y factores relacionados con el citoesqueleto	<i>Kinesin-like protein KIF20A</i>	O95235	101043	1(1)	106
	<i>Kinesin-like protein KIF2A</i>	O00139	80456	3(1)	89
	<i>Myosin-9</i>	P35579	227403	2(1)	56
	<i>Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 1</i>	O43166	200870	1(1)	57
	<i>Spectrin beta chain, non-erythrocytic 5</i>	Q9NRC6	418740	2(1)	57
Proteínas nucleares	<i>Lamin-B receptor</i>	Q14739	70980	1(1)	52
	<i>Emerin</i>	P50402	29022	1(1)	51
Proliferación (I)	<i>Coiled-coil alpha-helical rod protein 1</i>	Q8TD31	88847	1(1)	75

Proliferación (II)	<i>Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 2</i>	Q9P2F8	191974	1(1)	75
	<i>Nucleus accumbens-associated protein 1</i>	Q96RE7	57774	1(1)	62
	<i>Suprabasin</i>	Q6UWP8	25366	1(1)	59
	<i>Protein salvador homolog 1</i>	Q9H4B6	44698	1(1)	54
	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>	P50552	39943	1(1)	48
	<i>Serine/threonine-protein kinase WNK1</i>	Q9H4A3	251376	1(1)	44
	<i>Small proline-rich protein 3</i>	Q9UBC9	18510	1(1)	43
Metabolismo ADN	<i>DNA replication licensing factor MCM7</i>	P33993	81762	1(1)	87
Traducción	<i>60S ribosomal protein L10-like</i>	Q96L21	24871	1(1)	43
	<i>60S acidic ribosomal protein P2</i>	P05387	11658	1(1)	43
	<i>40S ribosomal protein S30</i>	P62861	6644	1(1)	42
Otras	<i>E3 SUMO-protein ligase PIAS1</i>	O75925	72572	1(1)	99
	<i>Lysozyme C</i>	P61626	16894	1(1)	81
	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	P00338	36895	1(1)	64
	<i>S-adenosylmethionine synthase isoform type-2</i>	P31153	43909	1(1)	55
	<i>DET1- and DDB1-associated protein 1</i>	Q9BW61	11874	1(1)	53

Nombre de proteína: nombre anotado de la proteína identificada mediante el análisis espectrofotométrico. **Número de acceso:** número de acceso a la proteína identificada en la base de datos de proteínas NCBI (non-identical NCBI protein database). **MW:** peso molecular nominal de la proteína identificada. **Péptidos identificados (no-redundantes) hCLE-CBD :** número de péptidos no redundantes emparejados desde la identificación más alta de la proteína en el análisis de huella peptídica y, entre paréntesis, número de espectros MS/MS que han sido emparejados con esta proteína. **Score:** puntuación de la proteína por Mascot. Este número refleja las puntuaciones combinadas de todos los espectros de masas que se han emparejado con las secuencias de aminoácidos contenidas en dicha proteína. Una mayor puntuación implica un emparejamiento más fiable.

Tabla 2: Proteínas asociadas a hCLE en el núcleo:

La tabla incluye proteínas para las que al menos se han identificado dos péptidos no redundantes con una tasa de descubrimiento de falsos negativos, FDR < 1% a nivel de péptido y presentes de forma exclusiva en las muestras de hCLE purificada o presentes tanto en las muestras de hCLE-CBD como en la CBD vacía, pero enriquecidas al menos 3 veces en las muestras de hCLE-CBD en comparación con el control CBD vacío (marcadas con asterisco). Se muestra su peso molecular, el número total de péptidos identificados con alta seguridad, el número de péptidos no redundantes y la puntuación otorgada por el análisis Mascot.

Tabla 3: Proteínas asociadas a hCLE en el citoplasma

Funciones	Nombre de la proteína	Número de acceso UniProtKB/Swiss-Prot	MW (Da)	Péptido identificado (no-redundante) hCLE-CBD	Puntuación hCLE-CBD
Factores de transcripción y procesamiento de RNAs	<i>Transcriptional repressor p66-beta</i>	Q8WXI9	65496	1(1)	83
	<i>Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog</i>	Q14692	146406	1(1)	72
	<i>Ribosomal biogenesis protein LAS1L</i>	Q9Y4W2	83795	1(1)	44
	<i>Bystin</i>	Q13895	49754	1(1)	43
Transporte y factores relacionados con el citoesqueleto	<i>Potassium-transporting ATPase alpha chain 1</i>	P20648	115425	1(1)	76
	<i>Syntaxin-18</i>	Q9P2W9	38788	1(1)	67
	<i>Spectrin beta chain, non-erythrocytic 5</i>	Q9NRC6	418740	2(1)	57
	<i>Rab11 family-interacting protein 5</i>	Q9BXF6	70556	1(1)	52
	<i>ATP-binding cassette sub-family F member 2</i>	Q9UG63	71704	1(1)	52
	<i>Fragile X mental retardation-interacting protein 2</i>	Q7Z417	76121	1(1)	45
	<i>Tight junction protein ZO-2</i>	Q9UDY2	134060	1(1)	44
	<i>Microfibrillar-associated protein 1</i>	P55081	51927	1(1)	42
	<i>Emerin</i>	P50402	29022	1(1)	37
	<i>Pericentrin</i>	O95613	380059	1(1)	35
Proliferación	<i>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing prot. 9</i>	Q13443	92521	1(1)	48
	<i>Migration and invasion-inhibitory protein</i>	Q5JXC2	43257	1(1)	35
Traducción	<i>40S ribosomal protein S15</i>	P62841	17029	1(1)	78
	<i>Putative 60S ribosomal protein L13a-like MGC87657</i>	Q6NVV1	12173	2(1)	68

* Leyenda compartida con la tabla anterior

Tabla 3: Proteínas asociadas a hCLE en el citoplasma

La tabla incluye proteínas para las que al menos se han identificado dos péptidos no redundantes con una tasa de descubrimiento de falsos negativos, FDR < 1% a nivel de péptido y presentes de forma exclusiva en las muestras de hCLE purificada o presentes tanto en las muestras de hCLE-CBD como en la CBD vacía, pero enriquecidas al menos 3 veces en las muestras de hCLE-CBD en comparación con el control CBD vacío (marcadas con asterisco). Se muestra su peso molecular, el número total de péptidos identificados con alta seguridad, el número de péptidos no redundantes y la puntuación otorgada por el análisis Mascot.

hCLE están implicadas en el metabolismo del RNA, e incluso, en ciertos casos, se ha descrito que se trata de proteínas de unión a RNA (como DDX1 y la propia hCLE (Castello, Fischer et al. 2012)). Por esta razón nos preguntamos si el RNA podría estar implicado en la formación de los complejos de hCLE, para lo cual los extractos preparados fueron tratados o no con RNAsa antes de realizar las cromatografías de exclusión por tamaño.

Las fracciones recolectadas fueron analizadas por Western Blot con anticuerpos de reconocimiento de hCLE y de algunas de las proteínas que interaccionaban con ella en ambos compartimentos celulares. El análisis de la fracción nuclear indicó que, en los extractos no tratados con RNAsa, el hCLE endógeno se encuentra presente en complejos de proteínas en un rango de tamaños menor o igual que 220-480 kDa, junto a DDX1, HSPC117 y FAM98B (Figura 7 A, panel izquierdo). El tratamiento con RNAsa de los extractos nucleares produce una disminución de los tamaños de los complejos donde está presente hCLE de aproximadamente lo equivalente a 3 fracciones de cromatografía y retiene una porción de HSPC117. Sin embargo, en estas condiciones las proteínas DDX1, Fam98B, y gran parte del HSPC117 presente en el extracto, permanecen unidas entre sí en un rango de tamaños idéntico a las condiciones

de no tratamiento con RNAsa (Figura 7 B, panel izquierdo). Por otro lado, la distribución del hCLE monomérico y dimérico en los extractos nucleares, muestra que en ausencia de RNAsa el monómero co-migra con DDX1, HSPC117 y Fam98B, en complejos ligeramente mayores (2 fracciones de cromatografía) que el hCLE dimérico. Sin embargo, en presencia de RNAsa el monómero de hCLE pasa a migrar junto al dímero, en complejos de tamaño ligeramente inferior a aquellos en los que migran sus proteínas acompañantes. Estos resultados apoyan la idea de que el hCLE endógeno nuclear se asocia a las mismas proteínas que el hCLE purificado y que dicha asociación está parcialmente mediada por RNA.

A continuación analizamos el comportamiento de los complejos del hCLE citoplasmático en las mismas condiciones. En este caso el hCLE de los extractos no tratados con RNAsa está presente en dos tipos de complejos: un primer complejo de gran tamaño (en torno a 2 MDa), en donde el hCLE no resistente a condiciones de desnaturalización (hCLE monomérico) co-migra con DDX1, HSPC117 y Fam98B, y un segundo complejo menor 480 kDa donde el hCLE resistente a condiciones de desnaturalización (hCLE dimérico) se encuentra libre de las proteínas acompañantes (Figura 7 A, panel izquierdo).

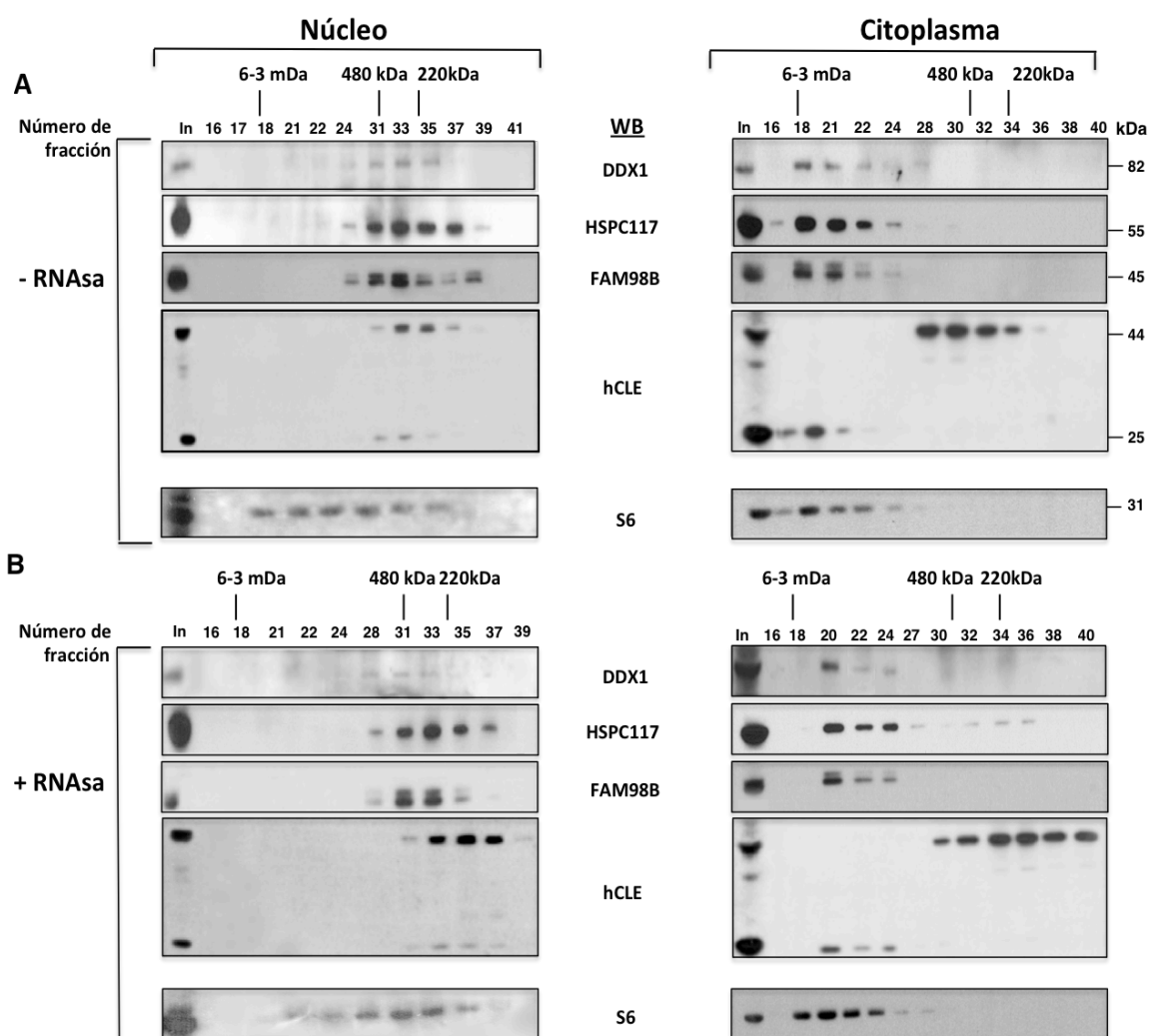


FIGURA 7: Cromatografía de exclusión por tamaño en presencia y ausencia de RNAsa.

(A); Cromatografía de exclusión por tamaño de extractos nucleares y citoplasmáticos en ausencia de RNAsa. Las fracciones de la cromatografía fueron analizadas en geles de acrilamida desnaturalizantes y revelados contra los distintos miembros del complejo; hCLE, DDX1, HSPC117 y Fam98B y contra la proteína ribosomal S6. **(B);** Cromatografía de exclusión por tamaño de extractos nucleares y citoplasmáticos de células HEK293T tratados con RNAsa.

El tratamiento con RNAsa produce de nuevo un descenso en los tamaños de ambos complejos, siendo mucho mayor dicha disminución de tamaño en los complejos que portan el hCLE dimérico. Sin embargo, en este caso el tratamiento no afecta al modo en el que hCLE co-migra con sus proteínas acompañantes ([Figura 7 B, panel derecho](#)).

Estos resultados indican que el RNA está presente en los complejos citoplasmáticos de hCLE, pero la asociación de hCLE con las otras proteínas caracterizadas es independiente de RNA, por lo que debería estar mediada por interacciones proteína-proteína. Además, los resultados indican que la forma de hCLE que es resistente a condiciones de

desnaturalización (hCLE dimérico) no se asocia a DDX1, HSPC117 ni Fam98B.

Los datos de proteómica también indicaban que, asociadas a hCLE había proteínas ribosomales de las subunidades 40S y 60S, así como proteínas relacionadas con el citoesqueleto (Tablas 3 y 4). Para analizar la distribución de las proteínas ribosomales con los diferentes complejos de hCLE endógena, las fracciones arriba indicadas también se sometieron a un análisis de Western Blot para la detección de proteína ribosomal total S6. El movimiento de la proteína S6 entre el núcleo y el citoplasma (movimiento tipo *shuttling*) ha sido extensamente caracterizado. Tras la traducción de S6 en el citoplasma, ésta es transportada al nucleolo donde se ensambla en subunidades pre-ribosomales 40S. Las subunidades nacientes se translocan al nucleoplasma, lo cual induce una vía de maduración específica de los ribosomas. Las subunidades pre-ribosomales maduras regresan al citoplasma donde finalmente se fusionan a las subunidad 60S para formar ribosomas funcionales maduros (Kruger, Zentgraf et al. 2007). El análisis de la distribución de la proteína S6 en el núcleo muestra que una porción de la misma co-migra con hCLE, DDX1, HSPC117 y FAM98B. Tras el tratamiento con RNAsa, S6 se mantiene en complejos de 220-480 kDa o mayores mientras que hCLE se encuentra mayoritariamente en complejos de en torno a 220 kDa. Estos resultados indican que S6 puede estar asociada con los complejos de hCLE-DDX1, HSPC117-FAM98B de un modo

dependiente de RNA. En cuanto a la distribución citoplasmática de S6, podemos observar que su migración se correlaciona de modo estricto con la presencia del hCLE monomérico en presencia o ausencia de tratamiento de RNAsa, junto a DDX1, HSPC117 y FAM98B, apoyando la existencia de un complejo donde estén presentes estas proteínas.

2.3 hCLE inmunoprecipita a los distintos miembros del complejo con distinto grado de eficiencia, aportando datos sobre la estructuración del complejo.

A fin de confirmar la interacción del complejo de hCLE y ahondar en el modo en que se éste se estructura, procedimos a realizar ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos dirigidos contra los distintos miembros del complejo.

Los resultados (Figura 8) muestran que hCLE es capaz de inmunoprecipitar a todos los miembros del complejo menos a Fam98B, cuya identificación resulta especialmente complicada debido a que su tamaño coincide con la subunidad menor de la inmunoglobulina. En estas condiciones destaca en especial la inmunoprecipitación de DDX1 en la cual la proteína se enriquece enormemente. DDX1 inmunoprecipita eficientemente a HSPC117 y a hCLE. HSPC117 solo se inmunoprecipita a sí mismo y Fam98B inmunoprecipita muy eficientemente a HSPC117 y con muy baja eficiencia a DDX1 y hCLE. Esto sugiere que las interacciones más fuertes se dan entre DDX1 y hCLE, y Fam98B

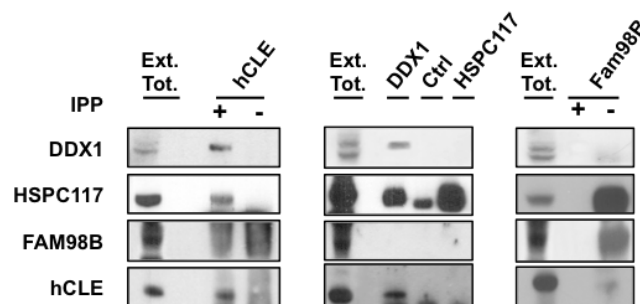


FIGURA 8: Inmunoprecipitación del complejo de hCLE

Extractos de células HEK293T fueron inmunoprecipitados con anticuerpos reactivos para hCLE, DDX1, HSPC117 y Fam98B y sus respectivos controles. Las fracciones inmunoprecipitadas se analizaron en geles desnaturalizantes PAGE-SDS y se revelaron mediante un *Western blot* contra DDX1, HSPC117, Fam98B y hCLE.

y HSPC117. El hecho de que HSPC117 no inmunoprecipite ningún miembro del complejo, mientras que, tanto hCLE como DDX1 y FAM98B sí son capaces de inmunoprecipitar HSPC117, apoya la idea de que hay una población intracelular de HSPC117 que no se encuentra formando parte de los complejos de hCLE, lo cual es coherente con los resultados de las cromatografías de exclusión por tamaño.

2.4 hCLE es necesaria para mantener los niveles del complejo hCLE-DDX1-HSPC117-FAM98B

A continuación estudiamos si hCLE modula la expresión de otros componentes del complejo hCLE-DDX1-HSPC117-FAM98B. Para ello infectamos células HEK293T con lentivirus que expresaban un shRNA control o shRNAs dirigidos contra dos regiones distintas del RNA mensajero de hCLE. A continuación preparamos extracto de proteína total de las células infectadas y lo analizamos por Western Blot con anticuerpos

para detectar hCLE, DDX1, HSPC117, FAM98B y β -actina como control.

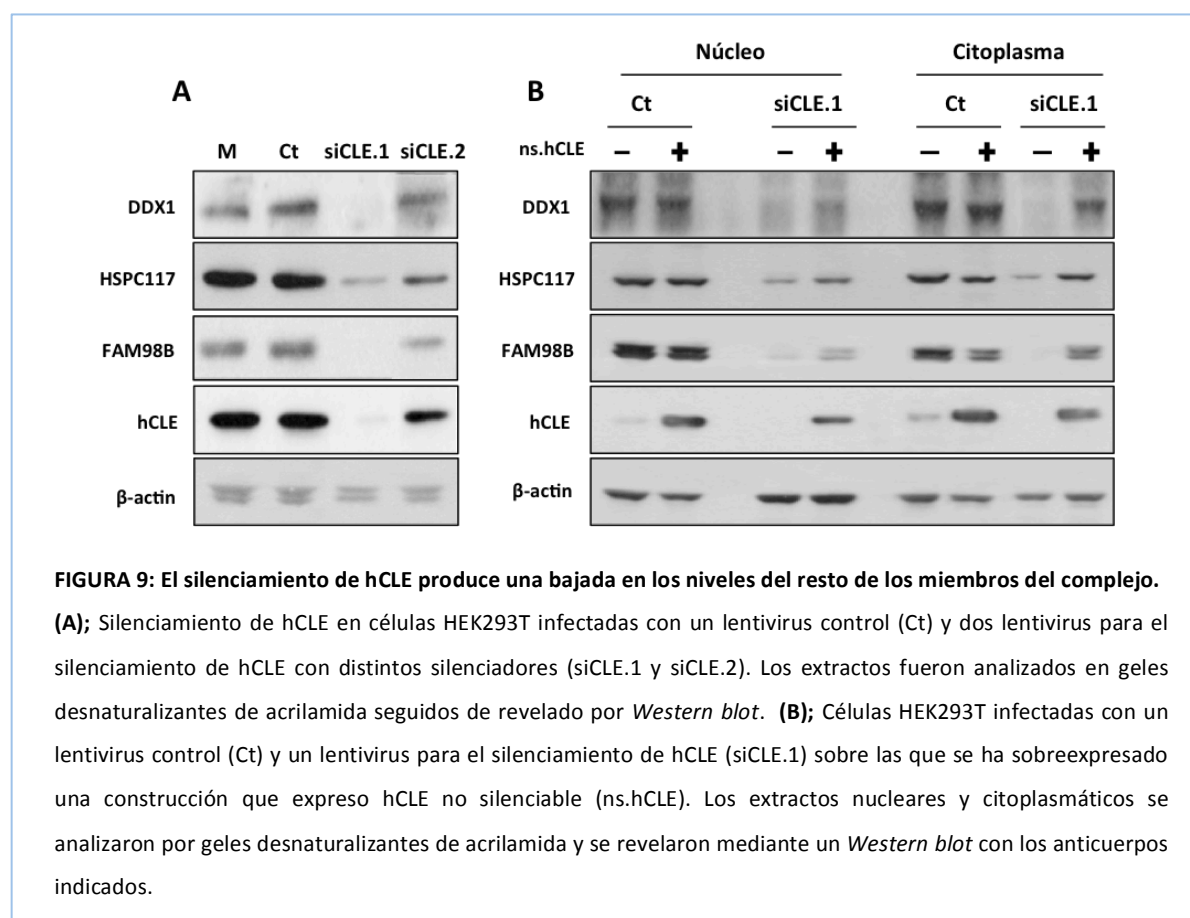
Se observa claramente que el silenciamiento de hCLE provoca una bajada de los niveles de las proteínas del complejo sin alterar la cantidad de β -actina (**Figura 9 A**). Además, analizamos la posibilidad de recuperar los niveles de las proteínas del complejo si recuperábamos los niveles de hCLE. Para ello transfectamos las células silenciadas con un plásmido que expresa un gen no silenciable de hCLE. Separamos fracciones nucleares y citoplasmáticas y analizamos la recuperación de los niveles de proteínas del complejo. Los resultados (**Figura 9 B**) mostraron que el silenciamiento de hCLE provoca una reducción en los niveles de proteínas acompañantes mientras que la sobreexpresión de hCLE sobre un fondo silenciado es capaz de recuperar parcialmente los niveles de dichas proteínas tanto en el núcleo como en el citoplasma. También se puede observar que la proteína del complejo menos sensible al

silenciamiento de hCLE es HSPC117 en la fracción citoplasmática. Estos datos sugieren que una disminución en los niveles de hCLE desestabiliza el complejo hCLE-DDX1-HSPC117-FAM98B e induce una degradación de las proteínas asociadas. El hecho de que HSPC117 sea menos sensible al silenciamiento vuelve a sugerir la existencia de una población celular de HSPC117 no contenida en el complejo de hCLE, lo cual es coherente con los resultados de las cromatografías de exclusión por tamaño y con las inmunoprecipitaciones. No obstante, todos los miembros del complejo de hCLE se ven afectados en mayor o menor medida por el fenómeno de silenciamiento, lo que indica que la regulación de cada una de las proteínas del complejo está estrechamente

ligada a la regulación de las demás, sugiriendo una fuerte interacción funcional. Mecanismos de regulación de este estilo han sido descritos en distintos sistemas moleculares, como por ejemplo: el complejo pequeño de la γ -tubulina, esencial para el componente mayor del material pericentriolar (Fant, Gnadt et al. 2009) o el complejo HRD1-SEL1L de mamíferos, que provee el andamiaje necesario para la degradación asociada al retículo endoplasmático (Iida, Fujimori et al. 2011).

3. Caracterización funcional de los complejos de hCLE

Los experimentos anteriores nos permitieron identificar un complejo de hCLE cuyos componentes parecían estar íntimamente



ligados funcionalmente. A continuación quisimos estudiar en qué tipo de procesos celulares podría estar implicado.

3.1 hCLE es una proteína tipo *shuttling*.

El complejo de hCLE se encuentra tanto en núcleo como en citoplasma y en cada compartimento se asocia con distintos grupos de proteínas implicadas en procesos de distintas categorías funcionales. Desconocíamos si esto se debía a que existían dos poblaciones de complejo diferentes, una ubicada en el núcleo y otra ubicada en el

citoplasma, especializadas en distintas funciones, o si bien, se trataba de un complejo capaz de moverse libremente entre el núcleo y el citoplasma de la célula (tipo *shuttling*) y que variaba relativamente su composición en función del compartimento subcelular en el que se encontrase. Para probar esta última idea, elaboramos una construcción que expresa hCLE fusionado a un GFP fotoactivable (PAGFP). En condiciones normales, esta PAGFP presenta una intensidad de fluorescencia baja, pero cuando incidimos

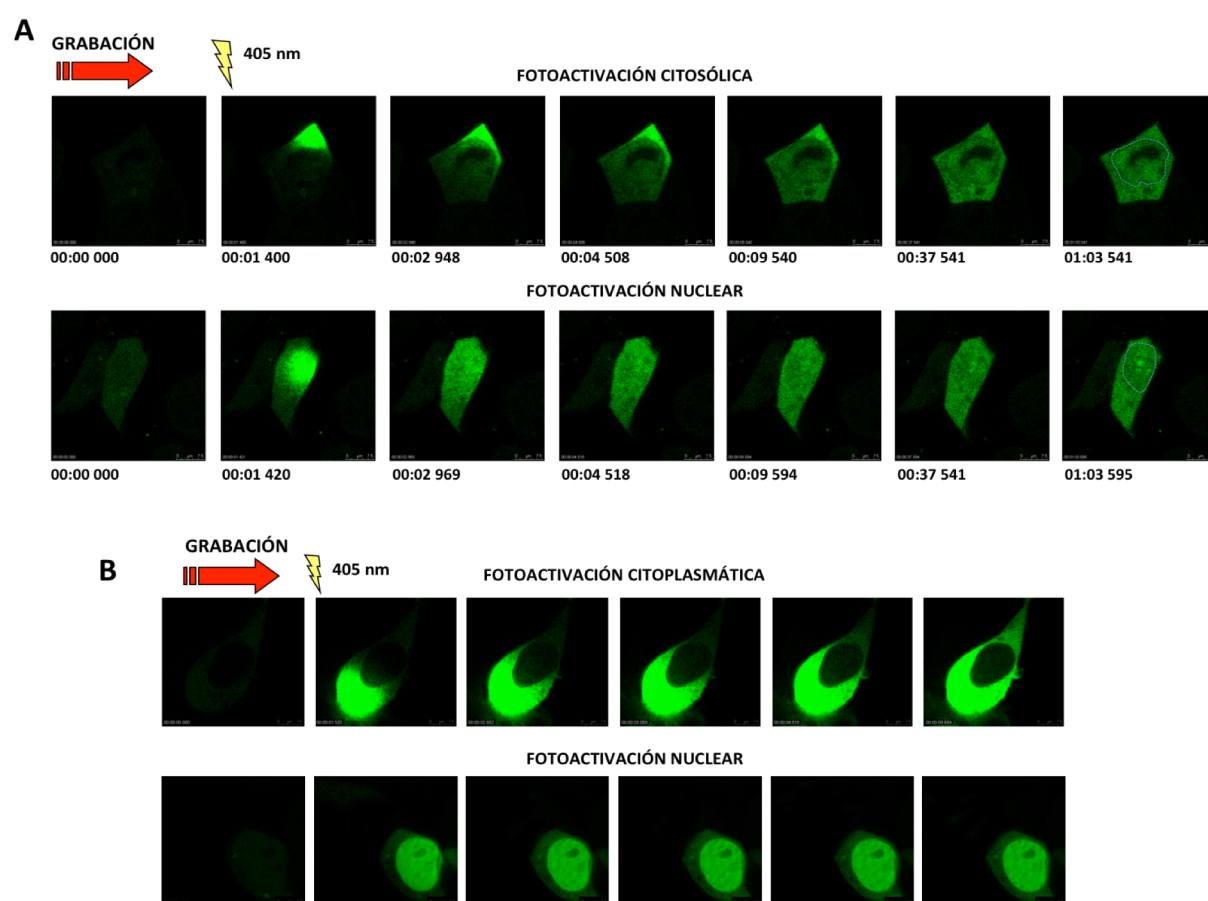


FIGURA 10: hCLE es una proteína de tipo *shuttling*.

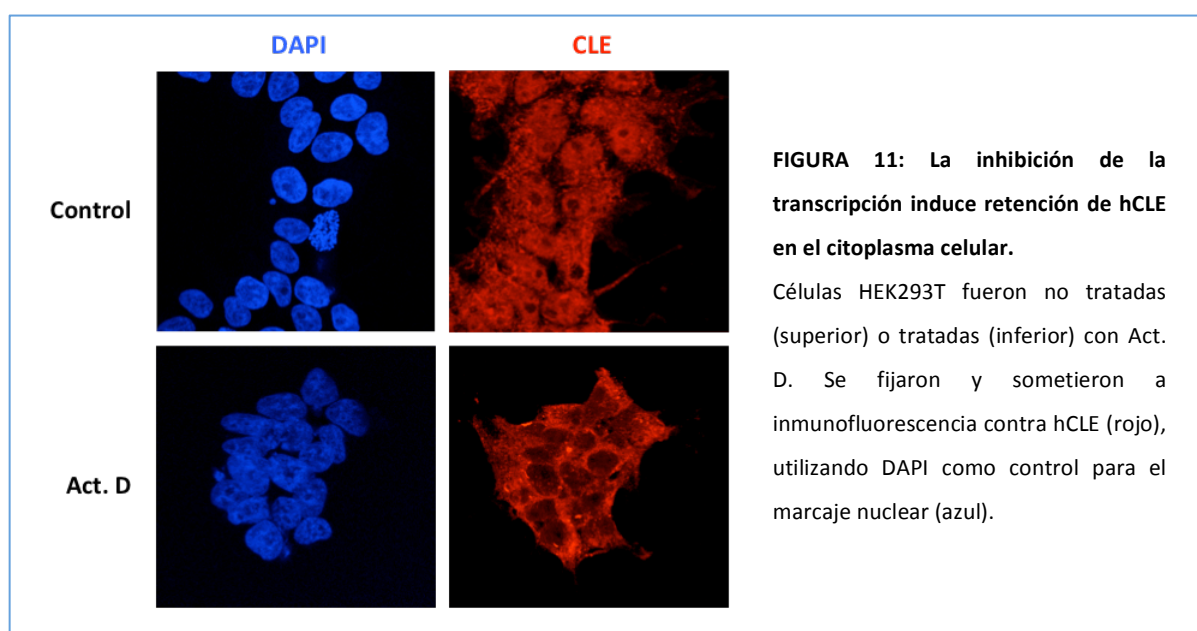
(A); Células HEK293T donde se ha dobleexpresado una construcción de hCLE fusionada con un GFP fotoactivable. Tras una fotoactivación de la proteína con un láser a 405 nm se graban los cambios que tienen lugar en las células durante el intervalo de tiempo indicado. En el panel superior la fotoactivación se ha realizado en citoplasma. En el panel inferior la fotoactivación se ha realizado en el núcleo. **(B);** Células HEK293T donde se ha expresado una proteína GFP fotoactivable control. En el panel superior la fotoactivación tiene lugar en el citoplasma y en el panel inferior en el núcleo.

sobre ella una longitud de onda de 405 nm, devuelve un pico de emisión cuantificable a 488 nm, que permite su seguimiento *in vivo*. Se transfectaron células HEK293T con dicho plásmido o su control vacío y 24 horas después se sometieron a ensayos de fotoactivación *in vivo*. La fotoactivación en el citoplasma nos permitió detectar la entrada de hCLE al núcleo (**Figura 10 A, panel superior**), mientras que la fotoactivación en el núcleo provocó la salida de hCLE del núcleo al citoplasma (**Figura 10 A, panel inferior**). La entrada de hCLE al núcleo se produce de modo más lento que su salida. Esto puede observarse en las imágenes representativas incluidas, donde 2 s y 969 ms tras la fotoactivación hCLE abandona el núcleo, mientras que la entrada al núcleo tras la fotoactivación citoplasmática le lleva 9 s y 540 ms. Probablemente estas diferencias de velocidad se deban a que el proceso de salida del núcleo al citoplasma se realiza por mecanismos de difusión simple, mientras que

la entrada al núcleo desde el citoplasma debe requerir de algún tipo de difusión facilitada a través de la membrana nuclear, teniendo en cuenta que los complejos citoplasmáticos de hCLE son de tamaños muy superiores a los nucleares. A modo de control repetimos el experimento empleando la fotoactivación de un PAGFP vacío en el núcleo y el citoplasma. Como podemos observar, tras la fotoactivación el control permanece mayoritariamente fijo en sus compartimentos iniciales, salvo una pequeña fracción de la proteína que es capaz de salir al citoplasma tras su fotoactivación nuclear (**Figura 10 B, panel inferior**). Estos resultados nos permitieron determinar que hCLE es una nueva proteína del tipo *shuttling*, cuya cinética de movimiento núcleo-citoplasmático varía de un compartimento a otro.

3.2 La actividad *shuttling* de hCLE depende de transcripción activa.

Como se ha indicado anteriormente, hCLE



parece estar íntimamente vinculada al metabolismo nuclear y citoplasmático del RNA. En células de mamífero, la salida del mRNA del núcleo suele estar acoplada a procesos activos de transcripción génica (Tokunaga, Shibuya et al. 2006). Por este motivo es razonable pensar que la distribución subcelular de proteínas de unión a RNA que pudieran estar implicadas en transporte de mRNA fueran dependientes de transcripción activa. Para analizar si este era el caso de hCLE, se trató a células HEK293T con Actinomicina D, un inhibidor general de la transcripción de RNAs, y a continuación se analizó la localización de hCLE por inmunofluorescencia. El tratamiento con

Actinomicina D producía un claro enriquecimiento del contenido de hCLE en el citoplasma, lo que sugiere que la inhibición de la transcripción de RNAs previene la entrada de hCLE del citoplasma al núcleo (Figura 11).

Para confirmar que la entrada de hCLE al núcleo estaba inhibida en células tratadas con Actinomicina D, células HEK293T fueron transfectadas con el plásmido de expresión de hCLE-PAGFP, tratadas con Actinomicina D y usadas en experimentos de fotoactivación de modo análogo al experimento indicado en el punto 3.1. Los resultados mostraron claramente que la inhibición de la transcripción bloquea la

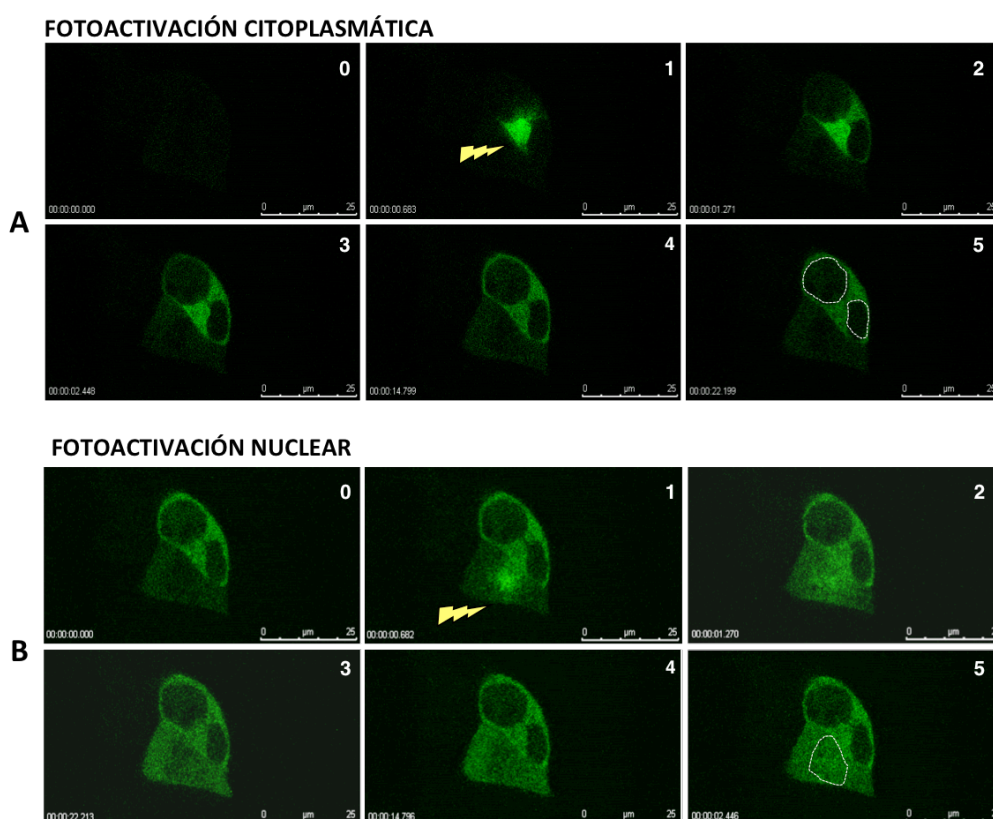


FIGURA 12: La inhibición de la transcripción inhibe el movimiento de hCLE del citoplasma al núcleo.

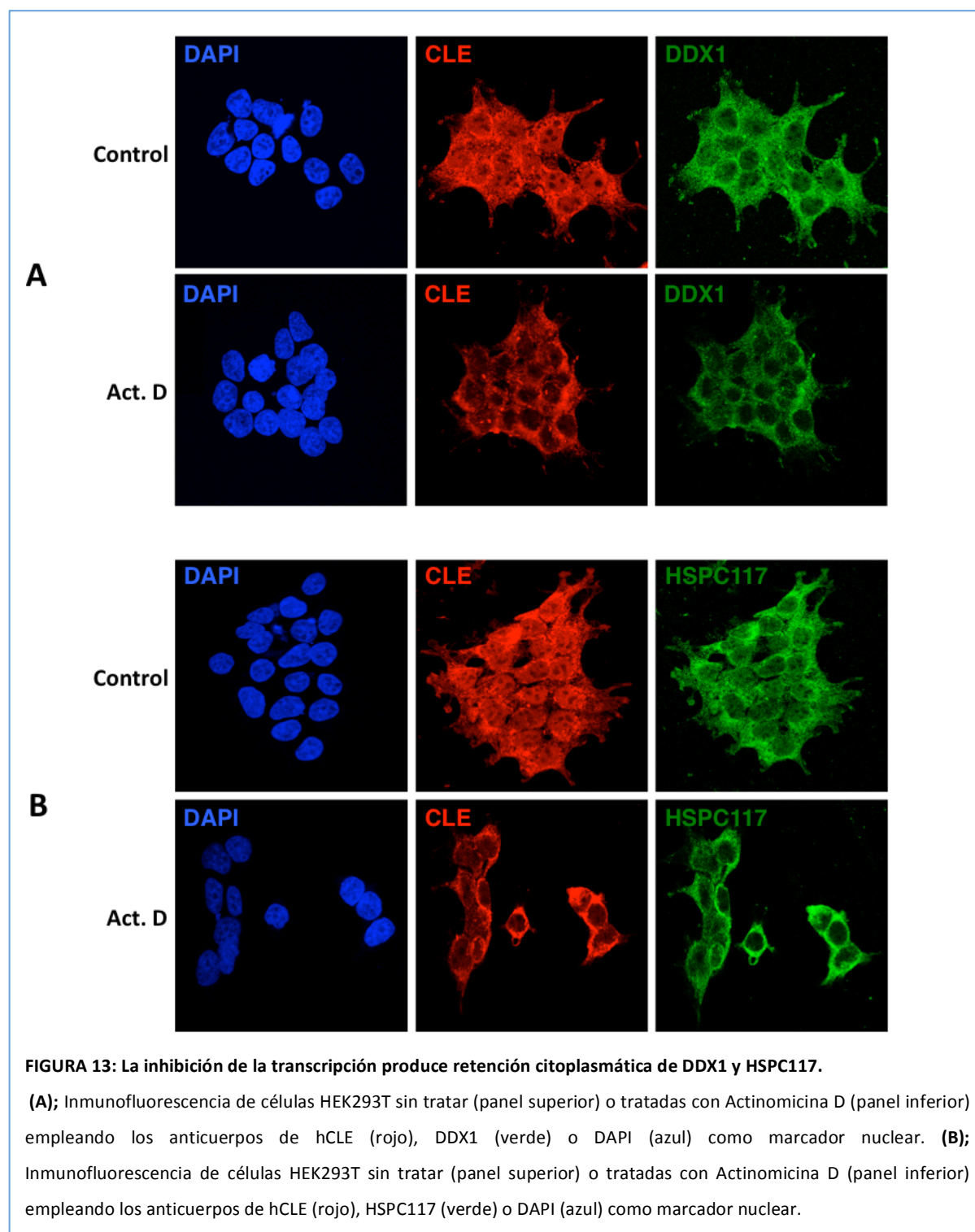
(A); Células HEK 293T tratadas con Actinomicina D donde se ha sobreexpresado la construcción de hCLE fusionada con un GFP fotoactivable y se ha inducido una fotoactivación citoplasmática (B); Mismas características que el apartado anterior, esta vez induciendo una fotoactivación nuclear.

entrada de hCLE del citoplasma al núcleo (**Figura 12 A**) sin afectar a su salida del núcleo al citoplasma (**Figura 12 B**).

3.3 Sus proteínas acompañantes poseen un comportamiento análogo al de hCLE.

Dado que el complejo hCLE-DDX1-HSPC117-FAM98B está funcionalmente

ligado, analizamos si la distribución núcleo-citoplasmática del resto del complejo también dependía de transcripción activa. Para ello células HEK293T control o tratadas con Actinomicina D fueron procesadas para análisis por inmunofluorescencia a fin de detectar la distribución subcelular de



HSPC117 y DDX1 (FAM98B no pudo ser analizada porque carecíamos de anticuerpos aptos para inmunofluorescencia) (Figura 13). En condiciones control tanto HSPC117 como DDX1 presentan un patrón de distribución principalmente citoplasmático. Sin embargo, el tratamiento con Actinomicina D produce un claro aumento de la retención de ambas proteínas en el citoplasma en paralelo al comportamiento de hCLE, lo cual refuerza la asociación funcional de los miembros del complejo.

Para confirmar estos resultados se realizó una separación núcleo-citoplasmática de células no tratadas o tratadas con 5 µg/ml de Actinomicina D durante 1 hora. Tras el tratamiento analizamos la presencia de hCLE, DDX1, HSPC117 y Fam98B en ambas fracciones, utilizando RNAP II y α-actina como control de la eficiencia de la separación (Figura 14). Como extractos totales utilizamos cantidades similares de fracción nuclear y citoplasmática en relación al número de células/volumen de extracción, y se puede observar que hCLE, DDX1, HSPC117 y Fam98B están eminentemente presentes

en el citoplasma y en muy baja cantidad en el núcleo. Por ello se incrementaron las cantidades de fracción nuclear respecto a la citoplasmática utilizadas para el análisis, pero manteniendo las relaciones entre muestras de células tratadas y no tratadas con Actinomicina D.

Los resultados confirman que el tratamiento con Actinomicina D produce un descenso en los niveles de estas proteínas en el compartimento nuclear, acompañado de un incremento en el compartimento citoplasmático. En conjunto, estos resultados indican que es necesario un estado de transcripción activa para permitir la localización de hCLE en el núcleo, probablemente como miembro de complejos de proteínas junto con DDX1, HSPC117 y FAM98B. Esto sugiere que el transporte del complejo de hCLE del citoplasma al núcleo requiere de la síntesis de nuevos RNA cargos.

3.4 Los complejos de hCLE unen a mRNAs de proteínas ribosomales y proteínas del metabolismo energético.

El tamaño de los complejos de hCLE

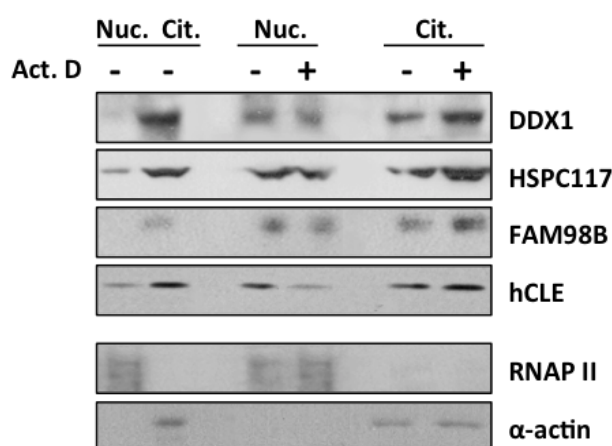


FIGURA 14: La inhibición de la transcripción aumenta la acumulación citoplasmática de hCLE, DDX1, HSPC117 y FAM98B.

Células HEK293T fueron tratadas o no con Actinomicina D durante 1h. Se separaron los extractos nucleares (Nuc) y citoplasmáticos (Cit) y se utilizaron para ensayos de *Western blot* para detectar las proteínas indicadas. RNAP II y α-actina fueron utilizados como marcadores de la eficiencia del fraccionamiento subcelular.

tanto en el núcleo como en el citoplasma celular, es parcialmente dependiente de RNA y estudios previos ya habían indicado que hCLE es una proteína de unión a RNA (Castello, Fischer et al. 2012). Sin embargo, la naturaleza de los RNAs transportados por el complejo de hCLE resultaba desconocida.

A fin de responder a esta pregunta se realizó una extracción y análisis de RNAs asociados a hCLE-CBD. Para ello se transfectaron células HEK293T con el plásmido hCLE-TAP y con el plásmido control TAP-vacío. A continuación se realizó la purificación por TAP de ambas muestras y se extrajeron los RNAs asociados. Para conservar en mayor medida la integridad de los RNAs, en lugar de realizar una purificación por TAP completa (ver apartado 4.2 de materiales y métodos), nos detuvimos tras el paso de digestión con la proteasa TEV. La purificación resultante se muestra en la [Figura 15 A](#). Los RNAs aislados de dos réplicas independientes de proteínas purificadas por

TAP y hCLE-TAP se emplearon para un análisis de secuenciación masiva empleando un dispositivo “*Illumina Genome Analyzer*” como se explica en materiales y métodos. Empleando un cambio relativo o *fold-change* > 2 y un valor de p ajustado <0.05, y tras eliminar los genes identificados como pseudogenes, se obtuvieron 41 genes unidos específicamente a hCLE-CBD y no al control CBD-vacío ([Tabla 4](#)). Un diagrama de los procesos biológicos en los que los RNAs unidos a hCLE están implicados se muestra en la [Figura 15 B](#). Como puede observarse, se encuentran claramente enriquecidos RNAs implicados en el control del ciclo de oxido-reducción mitocondrial, al igual que RNAs codificando proteínas implicadas en procesos de traducción, transporte iónico, metabolismo de carbohidratos y función neuronal entre otros. Los resultados también muestran que hCLE también es capaz de unir su propio mRNA.

TABLA 4: mRNAs asociados a hCLE con un enriquecimiento por encima de 2 veces respecto al control.

ID	Gen	Descripción	F.change	Valor P Ajust.	Función biológica
ENSG00000087302	C14orf166	chromosome 14 open reading frame 166	5.34	0.00000061	
ENSG00000198763	MT-ND2	mitochondrially encoded NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit 2	3.36		0Proceso oxidación-reducción.
ENSG00000281508	CDR1-AS	CDR1 antisense RNA	3.35		0Progesión del Alzheimer.
ENSG00000198886	MT-ND4	mitochondrially encoded NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit 4	2.78		0Proceso oxidación-reducción.
ENSG00000111640	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2.67		0Metabolismo de carbohidratos.
ENSG00000089157	RPLP0	ribosomal protein, large, P0	2.56		0Traducción.
ENSG00000198899	MT-ATP6	mitochondrially encoded ATP synthase 6	2.56		0Síntesis de ATP mitocondrial acomplado al transporte de iones.
ENSG00000169100	SLC25A6	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 6	2.5		0Transportador de proteínas a mitocondria.
ENSG00000172500	FIBP	fibroblast growth factor (acidic) intracellular binding protein	2.48	0.00843095	Señalización vía receptor del factor de crecimiento de fibroblastos.
ENSG00000140988	RPS2	ribosomal protein S2	2.44		0Traducción.
ENSG00000169692	AGPAT2	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2	2.44	0.00880524	Metabolismo de fosfolípidos.
ENSG00000087086	FTL	ferritin, light polypeptide	2.38	0.00000001	Transportador de iones de hierro.
ENSG00000112514	CUTA	cutA divalent cation tolerance homolog (E. coli)	2.33	0.00012812	Respuesta a iones metálicos.
ENSG00000125534	PPDPF	pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor	2.32	0.00058846	Diferenciación celular.
ENSG00000116521	SCAMP3	secretory carrier membrane protein 3	2.29	0.00262678	Transporte mediado por vesículas.
ENSG00000130313	PGL5	6-phosphogluconolactonase	2.29	0.00568708	Metabolismo de carbohidratos.
ENSG00000147955	SIGMAR1	sigma non-opioid intracellular receptor 1	2.28	0.00000092	Desarrollo del sistema nervioso.
ENSG00000122140	MRPS2	mitochondrial ribosomal protein S2	2.26	0.0009083	Función mitocondrial.
ENSG00000079462	PAFAH1B3	platelet activating factor acetylhydrolase 1b catalytic subunit 3	2.23	0.03199731	Proteína del metabolismo de lípidos. Desarrollo cerebral.
ENSG00000167513	CDT1	chromatin licensing and DNA replication factor 1	2.19	0.00002072	Punto de control de replicación.
ENSG00000005448	WDR54	WD repeat domain 54	2.18	0.03327398	Unión de proteínas.
ENSG00000089327	FXD5	FXD domain containing ion transport regulator 5	2.18	0.00981658	Transporte de iones.
ENSG00000198888	MT-ND1	mitochondrially encoded NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit 1	2.18		0Proceso oxidación-reducción.
ENSG00000108479	GALK1	galactokinase 1	2.16	0.03888922	Metabolismo de carbohidratos.
ENSG00000137309	HMG1	high mobility group AT-hook 1	2.16	0.00021528	Transcripción.
ENSG00000007080	CCDC124	coiled-coil domain containing 124	2.15	0.00182167	Ciclo celular.
ENSG00000074071	MRPS34	mitochondrial ribosomal protein S34	2.15	0.00002857	Función mitocondrial
ENSG00000103202	NME4	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 4	2.15	0.00000394	Metabolismo de nucleótidos.
ENSG00000167645	YIF1B	Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae)	2.15	0.0235604	No caracterizada.
ENSG00000137404	NRM	nurim (nuclear envelope membrane protein)	2.14	0.02445496	Proteína de membrana de la envuelta nuclear.
ENSG00000204628	GNB2L1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	2.14		0Ciclo celular.
ENSG00000161179	YDJC	YdjC homolog (bacterial)	2.12	0.00535578	Metabolismo de carbohidratos.
ENSG00000198712	MT-CO2	mitochondrially encoded cytochrome c oxidase II	2.1		0Transporte de electrones mitocondriales.
ENSG00000110492	MDK	midkine (neurite growth-promoting factor 2)	2.07	0.00023882	Desarrollo del sistema nervioso.
ENSG00000130811	EIF3G	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	2.07	0.00090737	Traducción.
ENSG00000065978	YBX1	Y-box binding protein 1	2.05	0.00001362	Transcripción.
ENSG00000149925	ALDOA	aldolase, fructose-bisphosphate A	2.05		0Metabolismo de carbohidratos.
ENSG00000013306	SLC25A39	solute carrier family 25 member 39	2.04	0.00491229	Traducción.
ENSG00000137106	GRHPR	glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	2.04	0.00544704	Proceso oxidación-reducción.
ENSG00000167770	OTUB1	OTU deubiquitinase, ubiquitin aldehyde binding 1	2.02	0.01970237	Reparación de DNA.
ENSG00000133112	TPT1	tumor protein, translationally-controlled 1	2.01		0Transporte de iones de calcio.

Tabla mostrando proteínas codificadas por mRNAs asociados a hCLE-CBD con un enriquecimiento (*fold change*) > 2 y con un valor P ajustado < 0.005. **ID:** identificador del Ensembl asociado al mRNA detectado; **Nombre:** nombre del gen anotado en la base de datos. **Descripción:** nombre completo de la proteína; **F-change:** enriquecimiento del RNA identificado en las muestras de hCLE-CBD en comparación con las muestras control del CBD vacío; **Valor P ajustado:** valor p tras aplicar la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. **Proceso biológico:** función de la proteína de acuerdo a la base de datos de GeneOntology.

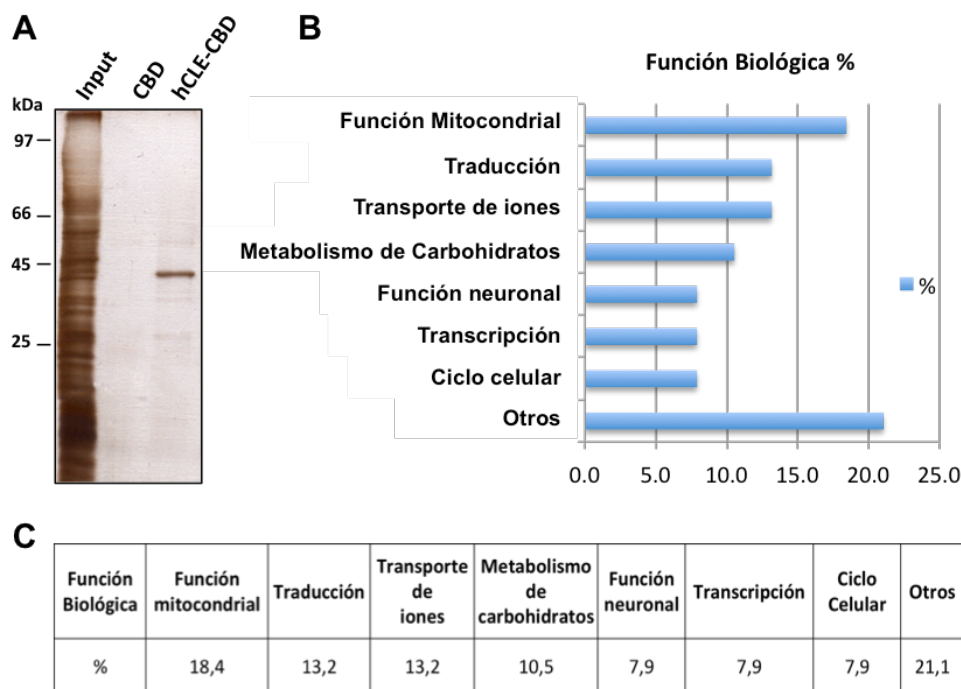


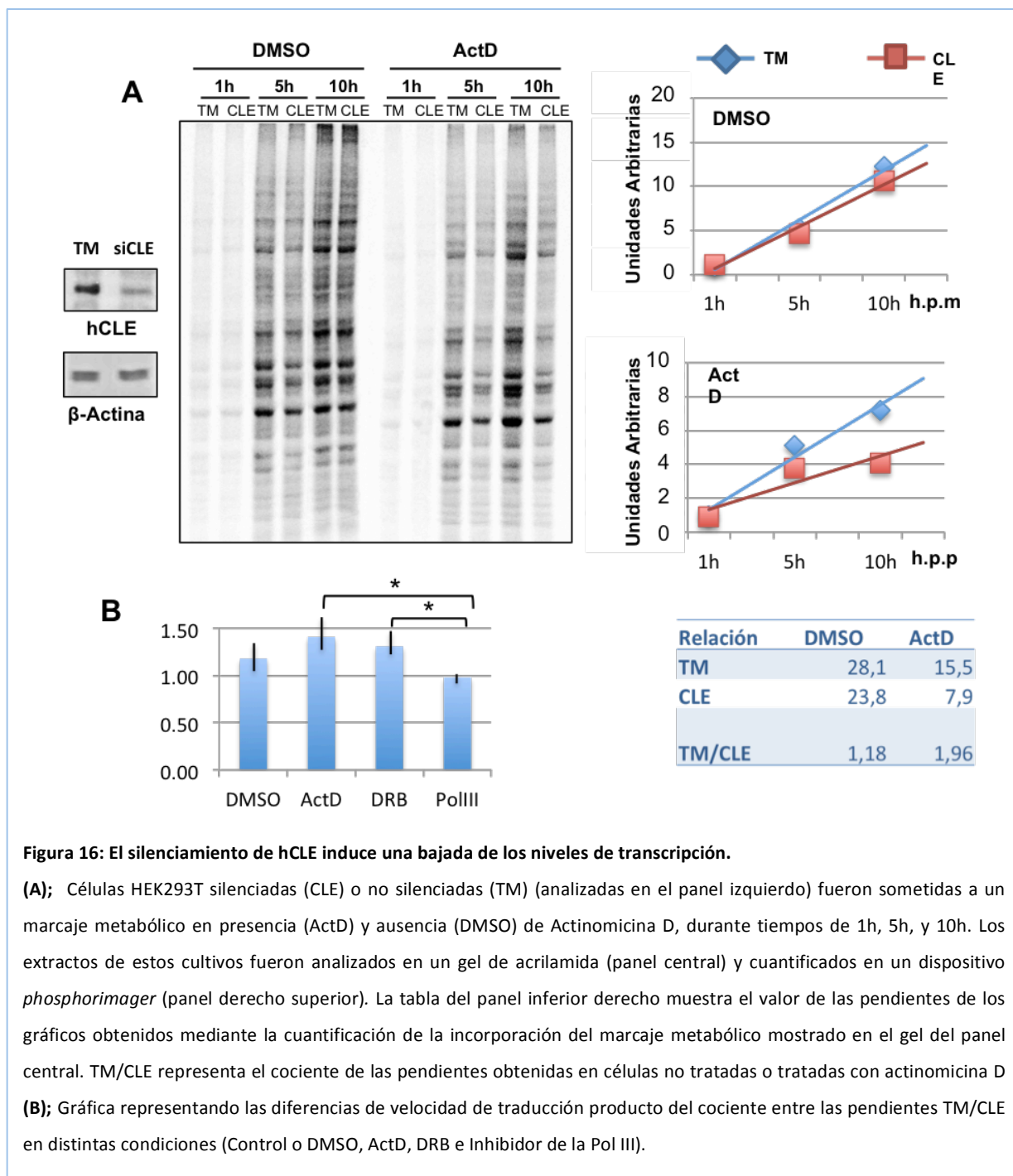
FIGURA 15: Grupos funcionales de mRNAs unidos al complejo de hCLE

(A); Gel de tinción de plata de la purificación de los extractos de TAP vacío y hCLE-CBD destinados al análisis de secuenciación masiva. **(B);** Gráfica mostrando la distribución de los grupos funcionales de los RNAs unidos por hCLE identificados tras el análisis de secuenciación masiva, clasificados en función de las anotaciones de la base de datos de GeneOntology. **(C);** Cuantificación del número de genes asociados a cada uno de los grupos funcionales identificados.

3.6 El complejo de hCLE modula positivamente la traducción de mRNAs.

Dado que el complejo de hCLE une RNAs especialmente ligados con procesos de traducción celular y metabolismo energético y su dinámica depende de transcripción activa, quisimos analizar si era importante para los procesos de traducción. Para ello cuantificamos los efectos del silenciamiento de hCLE en la síntesis de proteínas mediante experimentos de marcaje metabólico con una mezcla de aminoácidos metionina-cisteína marcados el isótopo de azufre 35 (^{35}S). Para anular los ya mencionados efectos del silenciamiento de hCLE en la transcripción de mRNAs, tratamos las células con

Actinomicina D. Este tratamiento inhibe la síntesis de nuevos mRNAs, de modo que los únicos efectos observables en la incorporación de ^{35}S a las proteínas son debidos a procesos independientes de la transcripción de mensajeros. En estas condiciones, si la presencia de hCLE es importante en la traducción de proteínas, en condiciones de silenciamiento deberíamos de observar una disminución del cociente de incorporación de ^{35}S a lo largo del tiempo que dura el marcaje en comparación con las células control. Este efecto debería de acrecentarse en las condiciones de tratamiento con Actinomicina D, al no haber nuevo aporte de mRNAs.



Para cuantificar este efecto medimos la señal de incorporación de ^{35}S a lo largo de un marcaje de 10 horas, a tiempos 1h, 5h y 10h (Figura 16 A, panel izquierdo). A partir de esta señal estimamos el cociente de incorporación de ^{35}S a lo largo del tiempo en células silenciadas frente a células control. Para ello tuvimos en cuenta el valor de las pendientes observadas en las distintas

condiciones (Figura 16 A, panel superior izquierdo) y calculamos el coeficiente entre los valores de incorporación de ^{35}S en las células control (TM) y las silenciadas para hCLE en cada condición (Figura 16 A, tabla del panel inferior derecho). Los resultados mostraron que el silenciamiento de hCLE provoca una bajada notable en la síntesis de nuevas proteínas. Esta bajada puede deberse

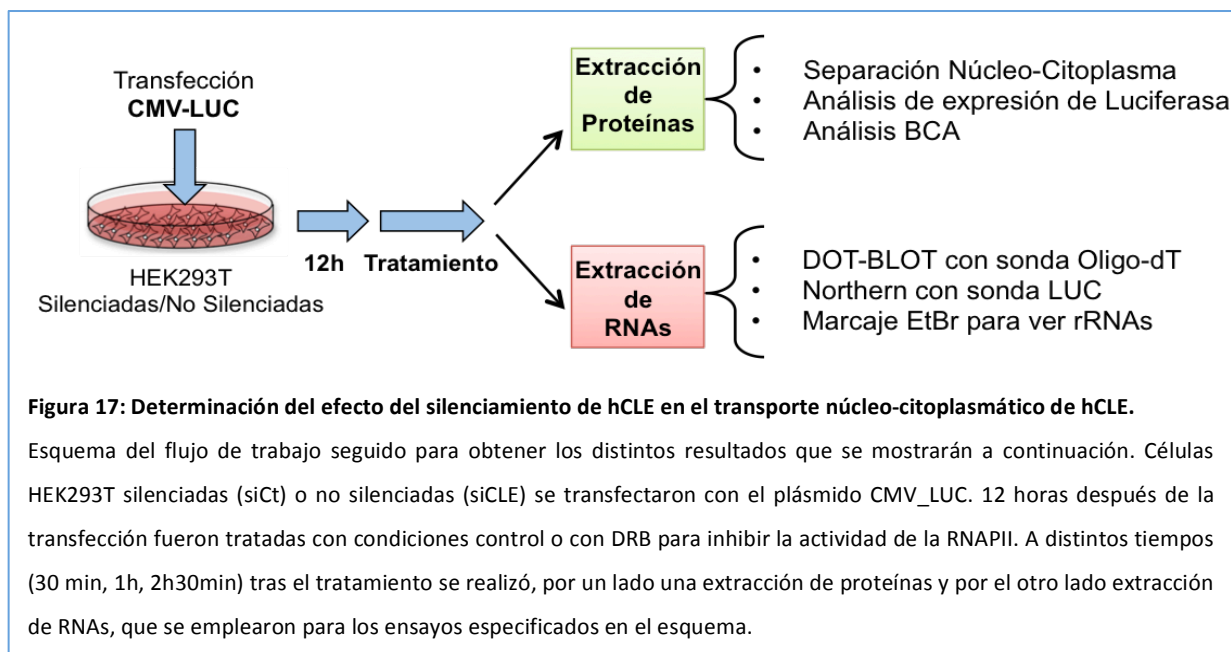
a distintos factores, tales como efectos en el transporte de RNAs del núcleo al citoplasma, alteraciones en la estabilidad de los RNAs o a un descenso en su traducibilidad por efectos sobre la maquinaria de traducción.

El tratamiento con Actinomicina D afecta principalmente a la transcripción de mRNAs expresados por la RNAP II, pero también afecta a la síntesis de RNAs de otra naturaleza importantes para la traducción de proteínas, tales como los tRNAs y otros RNAs reguladores transcritos vía RNAP III. Para tratar de discernir el grado en que la transcripción mediada por otras polimerasas de RNA afectaba a la traducción de proteínas en condiciones de silenciamiento de hCLE, tratamos a las células con inhibidores específicos de la transcripción de la RNAP II (DRB) y de la RNAP III (Pol III). Para ello células HEK293T silenciadas o no silenciadas, fueron transfectadas con un plásmido que expresaba la proteína Luciferasa *Firefly* bajo un promotor CMV (CMV-LUC). 12 horas post-transfección realizamos el tratamiento con las distintas drogas (DMSO como control, Actinomicina D, DRB y Pol III), y esperamos 1, 2.5 y 5 horas tras el tratamiento para analizar los niveles de expresión de luciferasa. El experimento fue realizado por triplicado, y los resultados muestran que, a pesar de no haber significancia estadística, tanto el tratamiento con Actinomicina D como el tratamiento con DRB tienden a acrecentar las diferencias entre los cocientes de traducción de las células silenciadas frente a las control. Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor

de la RNA Polimerasa III suprime estas diferencias de modo estadísticamente significativo (pvalue = 0.0338, ANOVA) (**Figura 16 B**). La RNAP III es la encargada de sintetizar distintos tipos de RNAs en la célula, tales como algunos RNAs ribosomales (5S), RNAs de transferencia, y ciertos RNAs pequeños implicados en el metabolismo de los mRNAs como U6 (*splicing*) o 7SK (elongación de la transcripción). El hecho de que inhibiendo la RNAP III seamos capaces de eliminar las diferencias de traducción inducidas por el silenciamiento de hCLE, sugiere que parte del efecto que hCLE tiene sobre la traducción podría ser debido a alteraciones en procesos asociados al mantenimiento del metabolismo y/o del procesamiento de los mRNAs. Esto es compatible con el tipo de RNAs que hCLE une específicamente, principalmente RNAs de proteínas ribosomales y relacionados con el metabolismo energético celular, esenciales en los procesos de traducción. Una vez bloqueados este tipo de mecanismos, las células no silenciadas no tendrían ventajas de funcionamiento respecto a las silenciadas para hCLE, y sus cocientes de traducción se igualarían, al igual que ocurre en nuestros resultados.

3.7 El complejo de hCLE afecta directamente a la traducibilidad de los mRNAs, sin afectar a su transporte ni a su estabilidad.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los efectos del silenciamiento de hCLE en la traducción del mRNA pueden



ser debidos a muy distintos factores. Atendiendo a los resultados del apartado anterior, hCLE parecía estar vinculada con mecanismos moleculares asociados al metabolismo del mRNA. Por esta razón analizamos la influencia del silenciamiento de hCLE en a) el transporte de los mensajeros del núcleo al citoplasma, b) la estabilidad de los RNAs y c) la traducibilidad de los RNAs.

Células HEK293T silenciadas y no silenciadas para hCLE fueron transfectadas con el plásmido de expresión CMV-LUC y sometidas a un tratamiento control con DMSO o con DRB para inhibir específicamente la transcripción mediada por la RNAPII. Tras 30 minutos, 1 hora 30 minutos y 3 horas de tratamiento, las células fueron procesadas para separar núcleos y citoplasmas, y posteriormente se extrajo el RNA de cada uno de estos compartimentos. Parte del extracto proteico se empleó para medir la cantidad de Luciferasa y estimar la cantidad de proteína total por BCA. Tras comprobar

que la separación había sido satisfactoria, se utilizaron los RNAs nucleares y citoplasmáticos para un ensayo de DOT-BLOT utilizando como sonda un oligonucleótido de 21 timidinas maracado terminalmente con YATP³². Se cuantificaron las diferencias de señal entre los núcleos y los citoplasmas en las distintas condiciones, utilizando como control de hibridación RNAs poliadenilados enriquecidos mediante cromatografía de afinidad con sefarosa-oligodT. Los mismos RNAs nucleares y citoplasmáticos fueron utilizados para un ensayo de Northern Blot que se hibridó con una sonda de luciferasa en el que se midieron los niveles de RNA ribosomal por señal de Bromuro de Etidio (EtBr). El proceso de obtención y uso de muestras se encuentra esquematizado en la **Figura 17**.

En primer lugar, para analizar si había efectos del silenciamiento de hCLE en el transporte de mRNAs del núcleo al citoplasma, se calculó la relación de mRNA

TABLA 5: Transporte Nucleocitoplasmático del mRNA Total (unidades arbitrarias)							
		siCt			siCLE		
		Cit.	Nuc.	Nuc./Cit.	Cit.	Nuc.	Nuc./Cit.
DMSO	30 min	4.7	4.4	0.9	4.7	4.2	0.9
	1 h	4.8	4.2	0.9	4.7	4.3	0.9
	2,30 min	4.7	4.5	0.94	4.7	4.3	0.9
DRB	30 min	5.1	4.4	0.86	5.1	4.6	0.9
	1 h	4.8	4.6	0.96	4.7	4.6	0.99
	2,30 min	4.7	4.8	1.0	4.9	4.5	0.93

TABLA 5: El silenciamiento de hCLE no afecta al transporte núcleo-citoplasmático general de mRNAs celulares:

Células HEK293T silenciadas (siCLE) o no silenciadas (siCt) para hCLE y no tratadas (DMSO) o tratadas (DRB), fueron utilizadas para la separación del RNA nuclear (Nuc) y citoplasmático (Cit). Estos RNAs fueron utilizados para un ensayo de Dot-Blot empleando una sonda contra la cola de Poli-Timidinas marcada con ^{32}P . Los RNAs nucleares y citoplasmáticos marcados fueron cuantificados en un dispositivo *Phosphorimager*. Se muestra la cuantificación obtenida, que se empleó para establecer una relación entre la cantidad de RNA nuclear y citoplasmático (Nuc/Cit).

TABLA 6: Estabilidad del mRNA de Luciferasa (unidades arbitrarias)							
		siCt			siCLE		
		Cit.	Nuc.	Nuc/Cit	Cit	Nuc.	Nuc/Cit
DMSO	30 min	-	5.4	-	6.9	5.6	0.8
	1 h	6.1	5.7	0.92	5.7	4.9	0.85
	2,30 min	5.6	5.2	0.94	5.7	4.4	0.8
	5 h	5.2	4.9	0.95	4.9	4.9	1.0
DRB	30 min	5.9	5.4	0.9	6.2	6	0.96
	1 h	5.3	5.3	1.0	5.4	6	1.1
	2,30 min	5.3	4.8	0.9	5	4.8	0.96
	5 h	5.8	6.6	1.14	6.2	6.3	1.01

TABLA 6: El silenciamiento de hCLE no afecta a la estabilidad del RNA de luciferasa.

Células HEK293T silenciadas (siCLE) o no silenciadas (siCt) para hCLE y no tratadas (DMSO) o tratadas (DRB), fueron transfectadas con un plásmido expresando el RNA de luciferasa (16h) y utilizadas para un experimento donde el RNA nuclear (Nuc) y citoplasmático (Cit) fue aislado y empleado para un ensayo de Dot-Blot empleando una sonda contra el RNA de luciferasa marcada con ^{32}P . Los RNAs nucleares y citoplasmáticos marcados fueron cuantificados en un dispositivo *Phosphorimager*. Se muestra la cuantificación obtenida, que se empleó para establecer una relación entre la cantidad de RNA nuclear y citoplasmático (Nuc/Cit).

TABLA 7: Traducibilidad del mRNA. Actividad LUC / mRNA LUC citoplasmático (unidades arbitrarias)						
	DMSO			DRB		
	Traducibilidad		(siCt/siCLE)	Traducibilidad		(siCt/siCLE)
	siCt	siCLE		siCt	siCLE	
30 min	169	114	1.48	172	125	1.38
1 h	139	75	1.8	121	68	1.78
2,30 min	112	78	1.43	101	52	1.94

TABLA 7: El silenciamiento de hCLE afecta a la traducibilidad del mRNA de luciferasa.

Células HEK293T silenciadas (siCLE) o no silenciadas (siCt) para hCLE y no tratadas (DMSO) o tratadas (DRB), fueron transfectadas con un plásmido expresando el RNA de luciferasa (16h) y utilizadas para un experimento donde extractos nucleares (Nuc) y citoplasmáticos (Cit) de RNA y proteína fueron aislados y empleados para un ensayo de Northern Blot utilizando una sonda contra el RNA de luciferasa marcada con ^{32}P , y para medir la actividad luciferasa.

Los RNAs nucleares y citoplasmáticos marcados fueron cuantificados en un dispositivo *Phosphorimager*. Se calculó la relación entre la actividad luciferasa y la cantidad de RNA de luciferasa en el citoplasma ("Traducibilidad" del RNA de luciferasa).

núcleo-citoplasmático previamente ajustado por los niveles de RNA total que estimamos por espectrometría (nanodrop). Los resultados, (Tabla 5) mostraron que el silenciamiento de hCLE no produce una retención de mRNA en el núcleo de las células, lo cual indica que los efectos en traducción no son debidos a un fallo en el transporte núcleo-citoplasmático de mRNAs. Cabe destacar que no había diferencias entre células tratadas con DMSO y con DRB.

En segundo lugar, para ver si el silenciamiento de hCLE tenía efectos en la estabilidad del RNA calculamos la relación entre la cantidad de mRNA de luciferasa, marcado con ribosondas anti-luciferasa en un ensayo de northern blot, y mRNA ribosomal, detectado por marcaje con EtBr. Los resultados mostraron que en las células silenciadas no hay una bajada sustancial de la cantidad de RNA de luciferasa respecto a las

células no silenciadas, lo que apunta a que el silenciamiento de hCLE no afecta a la estabilidad de los mRNAs (Tabla 6). En este caso tampoco había diferencias entre células tratadas con DMSO o DRB.

Por último, analizamos si el silenciamiento de hCLE influye negativamente en la traducibilidad de los mRNAs. Como medida de la cantidad de producto de traducción empleamos la cuantificación luminométrica de la expresión de Luciferasa, ajustada por los niveles de proteína total medidos por BCA. A continuación calculamos la relación entre los niveles de producto de traducción y la cantidad de mensajero de luciferasa disponible, debidamente ajustado respecto al RNA total en el apartado anterior. Los resultados (Tabla 7) mostraron que la traducibilidad de los mRNAs en condiciones de silenciamiento de hCLE es de media 2

veces menor que en las células control (p-value 0.0012). Además, el tratamiento con DRB, al igual que ocurría anteriormente con la Actinomicina D, parece incrementar esta diferencia.

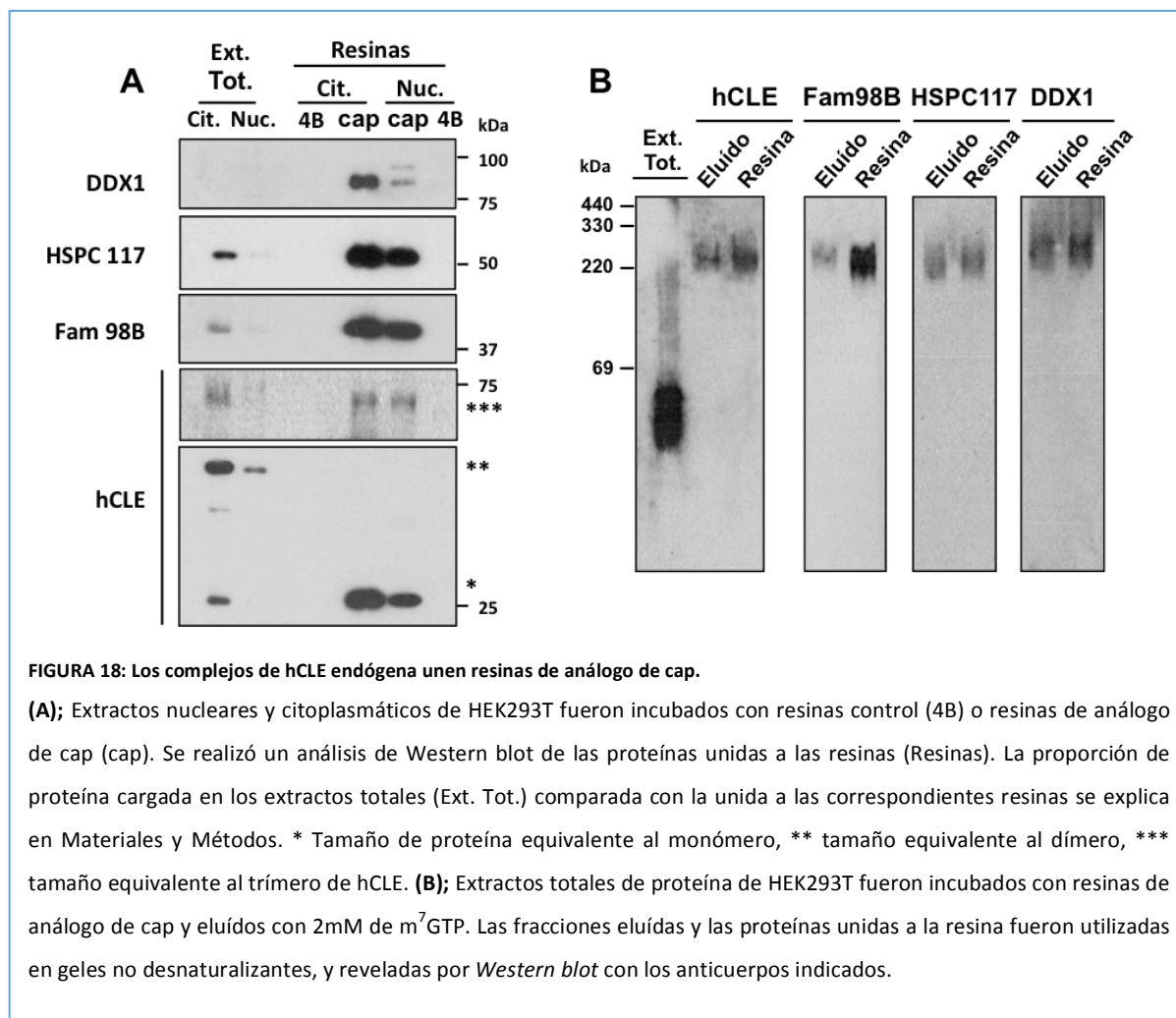
4. hCLE tiene capacidad de unir estructuras CAP

Los resultados previos indican que hCLE forma un complejo de proteínas que une RNAs mensajeros y que es requerido para mantener un grado normal de traducción en el citoplasma celular, afectando directamente a la traducibilidad de los RNAs. Además, algunos de los miembros del complejo son proteínas de unión a RNA que forman parte de gránulos de transporte de mRNAs en procesos de traducción localizada, donde se necesita bloquear la traducción para facilitar el transporte de los transcritos a los lugares diana. Por tanto, es posible que parte de los efectos del complejo de hCLE en traducción requieran una unión directa al RNA. Todos los RNAs portan en su secuencia regiones y estructuras que son clave a la hora de orquestar las distintas etapas de su metabolismo celular. Una de estas estructuras, presente en los mRNAs, es la estructura cap en el extremo 5'UTR. El 5' cap está presente en todos los RNAs mensajeros y algunos no mensajeros, y resulta indispensable para mantener la estabilidad del RNA y, en el caso de los mRNAs, para iniciar su traducción. Además el 5' cap es importante para el reclutamiento de distintos

complejos de RNPs al mRNA y resulta una pieza de clave para regular la traducibilidad de los mensajeros.

4.1 hCLE endógeno une análogos del 5' cap junto a sus acompañantes

Para estudiar si el complejo de hCLE unía estructuras 5' cap se realizaron ensayos de cromatografía de afinidad utilizando resinas de sefarosa 4B control (4B) o fusionadas a moléculas de 7 metil GTP o m⁷GTP (cap), que es un análogo de las estructuras 5' cap. Para ello células HEK293T fueron procesadas para obtener extractos de proteína nuclear y citoplasmática. A continuación los extractos se incubaron con las respectivas resinas 4B y cap, y se analizaron por *western blot* las proteínas del complejo que habían permanecido unidas a las resinas (**Figura 18 A**) Los resultados muestran que todos los miembros del complejo de hCLE se unen específicamente a las resinas de m⁷GTP, pero no a las resinas control. Además, la fracción de hCLE que se une a resina es la monomérica (la que va siempre acompañada del resto del complejo), y no la dimérica, que se presenta en su totalidad en la fracción no retenida en la resina. Además, en las fracciones unidas a resina, tanto nucleares como citoplasmáticas, se produce un enriquecimiento claro de los miembros del complejo respecto al extracto original, lo que implica que la capacidad de unión es muy elevada. Así pues estos resultados confirman que el complejo de hCLE une análogos de estructuras 5' cap.



A continuación, quisimos comprobar si los distintos miembros del complejo unían a los análogos de 5' cap en el mismo tipo de complejos proteicos o si bien lo hacían en complejos de rangos de tamaño diferentes. Para ello realizamos un ensayo de unión a resinas de m^7GTP , del mismo modo que en el apartado anterior, pero, en esta ocasión, se realizaron eluciones con 2mM de m^7GTP libre. Las eluciones (E) y la proteína no eluida (R) se analizaron en un gel nativo de gradiente 4-20% seguido de un análisis por *western blot* de los distintos miembros del complejo (Figura 18 B). Los resultados muestran que todas las proteínas del complejo eluyen en el mismo rango de

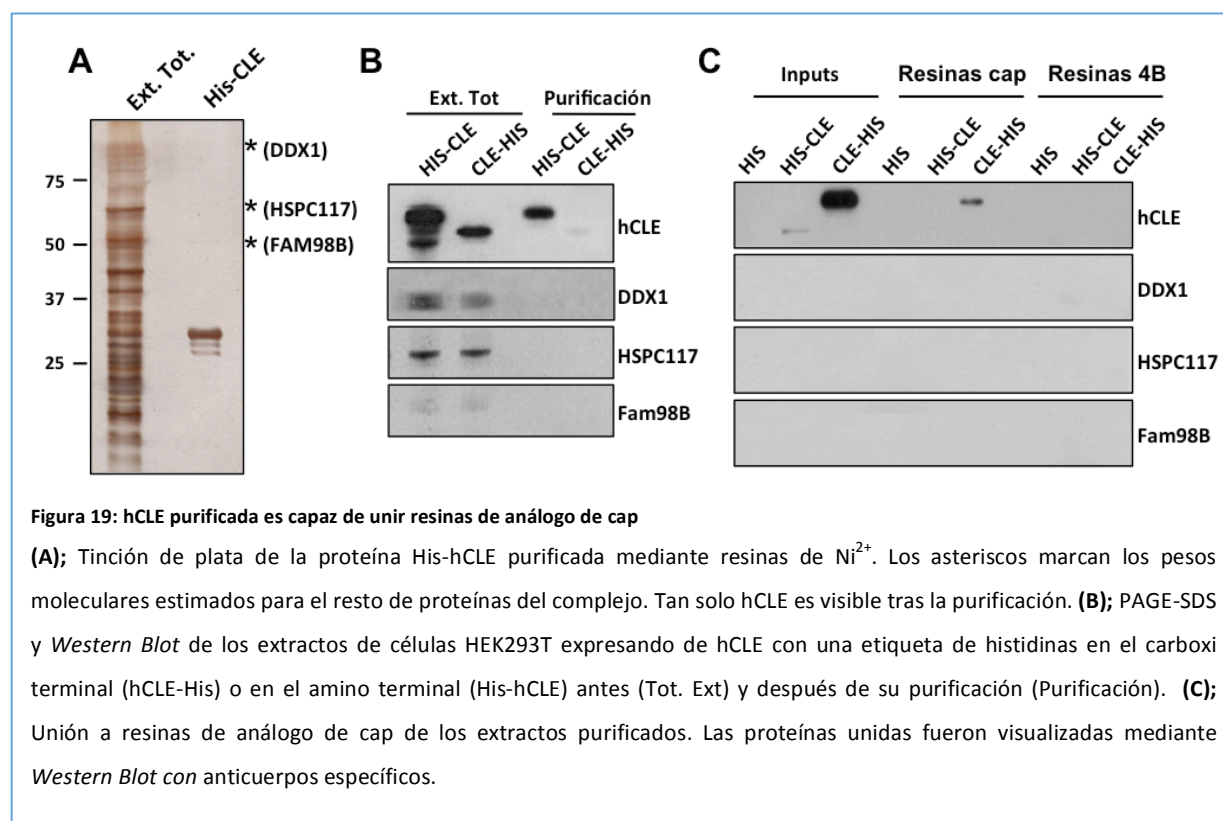
tamaños, que va de 220 a 330 kDa. Este resultado sugiere que los distintos miembros del complejo de hCLE reconocen a los análogos de 5' cap como complejo, y no en poblaciones subcelulares diferentes.

4.2 hCLE purificada continua uniendo análogos de 5' cap.

A continuación estudiamos si la proteína hCLE purificada también es capaz de unir análogos de 5' cap. La purificación por TAP utiliza condiciones relativamente suaves durante el proceso de purificación de modo que los complejos fuertemente unidos, como el de hCLE, se mantienen prácticamente intactos. Por lo tanto, a fin de ensayar la

capacidad de unión de una proteína hCLE totalmente purificada a m^7GTP , procedimos con otros sistemas de purificación más estrictos, como son las etiquetas de Histidinas. Empleamos un sistema de transfección-infección con Vaccinia T7 para obtener extractos proteicos de células HEK293T que expresaban hCLE fusionado por el carboxi-terminal o el amino-terminal, a una etiqueta de histidinas. Primero comprobamos la purificación por revelado con nitrato de plata y por ensayo de *Western Blot* contra las distintas proteínas del complejo (**Figura 19, panel superior izquierdo y derecho, respectivamente**). Los resultados muestran que mediante el sistema de purificación con His, no se mantienen las interacciones de hCLE con sus acompañantes, de modo que se obtiene una proteína purificada prácticamente a homogeneidad. A

continuación, la proteína purificada se incubó con las resinas control o las resinas de m^7GTP y se analizó su capacidad unión a las mismas (**Figura 19, panel inferior**). Como puede observarse, la proteína hCLE purificada por el dominio amino-terminal es capaz de unirse a las resinas de análogo de 5' cap en ausencia de sus proteínas acompañantes. La proteína purificada a partir del dominio carboxi-terminal se expresa y purifica con mucha menor eficiencia, por lo que no es posible detectarla en la fracción unida a la resina con estos niveles de exposición. Mediante una exposición más prolongada de la membrana sí puede ser visualizada. Por otro lado, los resultados observados con la proteína purificada por el dominio amino-terminal implican que hCLE, sin ayuda de sus acompañantes, es capaz de reconocer m^7GTP y unirse a él.



Para analizar si las demás proteínas del complejo, purificadas a homogeneidad, también tenían capacidad de unión a análogos de 5' cap, se intentaron purificar por cromatografías de Ni^{+2} las proteínas HSPC117 y DDX1 expresados como proteínas de fusión con histidinas, pero resulto imposible el análisis al permanecer éstas en la fracción de proteínas insolubles. De cualquier modo, el resultado obtenido con la purificación de hCLE muestra que, independientemente de que sus proteínas acompañantes puedan fomentar la unión, ella sola es capaz de unir análogos de 5' cap y que, por tanto, es una proteína de unión a cap o *cap-binding protein*.

4.3 El complejo de hCLE une análogos de 5' cap con mayor afinidad y especificidad que eIF4E

A continuación caracterizamos la afinidad y especificidad con que el complejo se une a los análogos de 5' cap. Para ello realizamos dos tipos de ensayos: a) ensayos de competición durante la incubación y b) ensayos de elución. Como control de proteína de unión a 5' cap utilizamos la proteína eIF4E, ampliamente caracterizada.

Como primera aproximación realizamos una serie de ensayos de competición, en los cuales, durante la incubación de los extractos proteicos con las resinas estaban presentes distintas concentraciones (2mM y 10mM) de posibles competidores moleculares del m^7GTP , en concreto GTP y ATP. Tras la incubación

analizamos la cantidad de proteína que permanecía unida a la resina. Los resultados (Figura 20 A) indican que hCLE posee más afinidad por el análogo de 5' cap, ya que solo es sensible a la presencia de competidor cuando este se encuentra a muy elevada concentración (10mM) en comparación con eIF4E que ya es competido en su totalidad a 2mM de m^7GTP . También se puede observar que hCLE presenta una mayor especificidad por el 5' cap que el factor eIF4E, ya que, a diferencia de eIF4E, hCLE no es sensible a la competición con GTP.

A continuación realizamos ensayos de elución de las resinas de análogos de 5' cap analizando tanto hCLE como los otros componentes del complejo. Los experimentos de elución de resinas comienzan realizando una incubación convencional del extracto proteico de HEK293T con las resinas de análogos de 5' cap en ausencia de competidores. Tras una incubación de los extractos totales con la resina de m^7GTP seguida de una serie de lavados para eliminar uniones inespecíficas, las resinas fueron tratadas con soluciones que contienen distintos competidores de m^7GTP , a distintas concentraciones (0.05, 0.1 y 1 mM). Estas soluciones son añadidas consecutivamente sobre la misma resina. Al terminar el tratamiento se analiza por Western Blot el contenido de proteínas de cada una de las eluciones así como las proteínas que han permanecido unidas a la resina (Figura 20 B). Se observa que la fracción de hCLE de mayor elución se produce

cuando aplicamos m^7GTP libre a 0.1mM mientras que eIF4E eluye a 0.05mM de m^7GTP . Por otro lado, se observa que hCLE apenas se eluye a concentraciones elevadas de GTP o ATP, mientras que eIF4E sí eluye a concentraciones altas de GTP.

Por otro lado, las proteínas acompañantes de hCLE presentan un patrón de elución análogo al de hCLE, a excepción de HSPC117, que es eficazmente eluido por GTP. Esto podría indicar, o bien que HSPC117

posee capacidad intrínseca de unirse al 5'cap, o bien que HSPC117 reconoce 5'cap vía hCLE pero su interacción con hCLE de algún modo está modulada por GTP. Probablemente HSPC117 reconoce el m^7GTP de forma inespecífica dada su afinidad por el GTP, ya que, como se ha mencionado anteriormente, HSPC117 es una ligasa de RNA dependiente de GTP. De cualquier modo, el comportamiento de HSPC117 implica que la unión de hCLE a la resina no está mediada

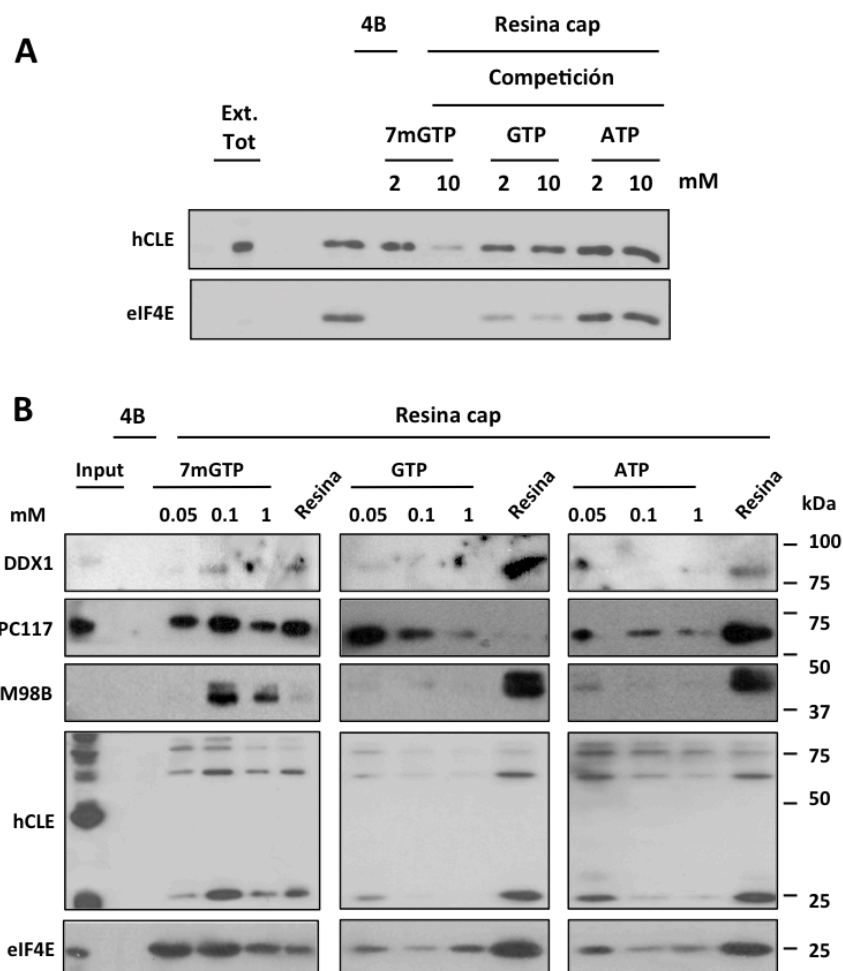


Figura 20: hCLE une cap con mayor afinidad y especificidad que el factor eIF4E

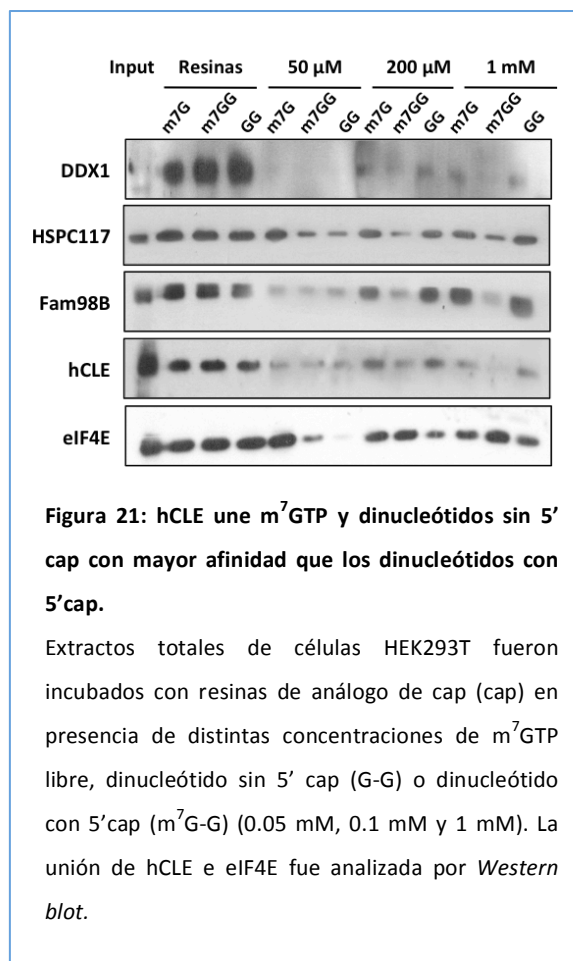
(A); Extractos totales de células HEK293T fueron incubados con resinas de análogo de cap (cap) o resinas control (4B) a distintas concentraciones de m^7GTP , GTP o ATP (2 mM y 10 mM). La unión de hCLE e eIF4E fue analizada por *Western Blot*. **(B);** Extractos totales de células HEK293T fueron incubadas con resinas de análogo de cap y resinas control. La proteína unida a la resina fue eluida de modo secuencial con concentraciones crecientes de m^7GTP , GTP o ATP (0.05 mM, 0.1 mM y 1 mM). Las proteínas eluidas y las que permanecieron unidas a la resina fueron analizadas por *Western blot*.

por HSPC117.

Cabe señalar que el patrón de bandas sensibles al anticuerpo de hCLE en el rango de tamaños de 65 a 75 kDa, mencionados anteriormente, y que podrían corresponder a un trímero de hCLE resistente a condiciones desnaturizantes, co-eluyen de la resina de modo totalmente análogo al del monómero de hCLE, lo cual sugiere que estas bandas corresponden a hCLE.

4.4 hCLE tiene más afinidad por mononucleótidos metilados que por dinucleótidos metilados

Seguidamente caracterizamos con más detalle la especificidad de hCLE y su complejo por el 5' cap realizando ensayos de elución con distintos competidores del 5' cap: 7metil-(5')GTP (m^7 GTP), 7metilG(5')ppp(5')G (m^7 G-G) y G(5')ppp(5')G (G-G), que presentan cambios más sutiles respecto al m^7 GTP que los mononucleótidos ATP y GTP. En concreto el m^7 G-G es un dinucleótido con 5' cap, un análogo más aproximado a los 5'cap-RNAs; y G-G es un dinucleótido sin estructura cap, lo cual presenta el mejor análogo de RNAs sin cap. Los resultados (Figura 21) muestran que hCLE presenta un patrón de afinidad diferente a eIF4E en cuanto a los análogos de cap. En concreto, eIF4E presenta una gran afinidad por el m^7 GTP libre seguido de los dinucleótidos con cap y por último los dinucleótidos sin cap. Sin embargo hCLE presenta su mayor afinidad por el m^7 GTP libre, seguida del dinucleótido sin cap y por último del dinucleótido con cap. El resto de



los miembros del complejo se comportan de forma análoga a hCLE. Esto implica que el complejo de hCLE tiene mayor preferencia por el m^7 GTP libre y por los RNAs sin 5'cap que por los 5'cap -RNAs.

4.5 Los complejos de alto peso molecular de los que forma parte hCLE son esenciales para la unión a las resinas de análogos de 5'cap

Como ya se ha explicado anteriormente, hCLE forma dímeros resistentes a condiciones desnaturizantes y estos dímeros, a su vez, forman parte de complejos de alto peso molecular que son regulados por agentes reductores. Para evaluar si estos complejos de alto peso molecular podrían ser importantes para unión de hCLE a análogos de 5'cap,

realizamos análisis de unión en condiciones cambiantes de agentes reductores y observamos si desencadenaban cambios en la eficiencia de unión a los análogos de 5'cap. Empleando dos concentraciones diferentes de DTT, 1mM (la habitual) y 100 veces menor, realizamos un ensayo de unión a resinas (**Figura 22 A**). Observamos que a concentraciones más bajas de DTT la eficiencia de la unión de hCLE a las resinas es mayor que a concentraciones más elevadas, mientras que la eficiencia de unión del factor 4E no se ve alterada.

A continuación analizamos, en geles nativos, la diferencia en las eficiencias de unión y elución de la resina con análogo de 5'cap libre, en presencia o ausencia de DTT. En ausencia de DTT (**Figura 22 B, panel izquierdo**) las bandas reactivas a hCLE en el extracto total se mantienen en complejos de

alto peso molecular mayores de 220 kDa. Estos complejos se unen eficientemente a las resinas, pero eluyen de las mismas con muy poca eficiencia. En presencia de DTT (**Figura 22 B, panel derecho**) los complejos de alto peso molecular prácticamente desaparecen, convirtiéndose en complejos de en torno a 300kDa y también en formas de 50kDa (compatibles con el dímero de hCLE) y 25 kDa (compatibles con el monómero). El análisis de la unión a la resina en estas condiciones muestra que los tamaños de los complejos que eluyen son idénticos a los obtenidos en ausencia de DTT (algo mayores de 220 kDa), y apenas queda proteína retenida en la resina. Estos resultados sugieren que hCLE se une a m⁷GTP en complejos de muy alto peso molecular susceptibles a condiciones desnaturalizantes.

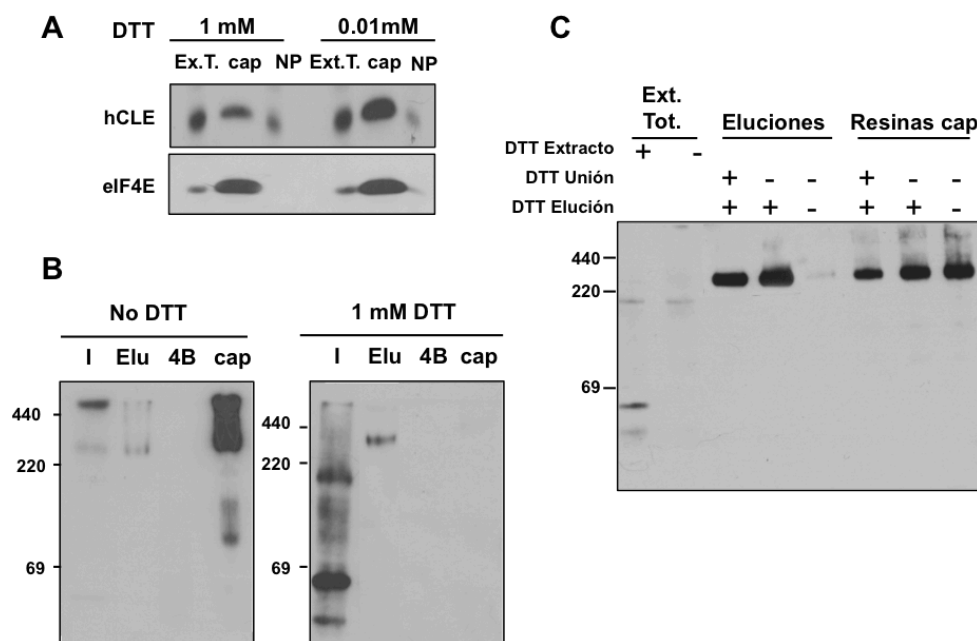


Figura 22: La unión a cap de hCLE se ve facilitada cuando se encuentra en complejos de alto peso molecular sensibles a condiciones desnaturizantes.

(A); Extractos totales de células HEK293T fueron tratados con concentraciones distintas del agente reductor DTT (1mM y 0.01mM) e incubadas con resinas de análogo de cap. Los extractos totales (Ex.T.), proteína unida a la resina (R7m) y proteína no unida a la resina (NP) fueron revelados contra hCLE y el factor eIF4E por *Western blot*. **(B);** Extractos totales de células HEK293T fueron no tratados (No DTT) o tratados (1mM DTT) con agentes reductores, incubados en resinas control (4B) o de m⁷GTP (cap) y eluidos con 1mM de m⁷GTP libre. Las proteínas del extracto total (Ex. T.), fracción eluida (Elu), y las que permanecieron unidas a las resinas control y resinas de análogo de cap tras las eluciones fueron analizadas por *Western Blot* contra la proteína hCLE. **(C);** Extractos totales de células HEK293T fueron no tratados (-) o tratados (+) con 1mM de DTT en distintas fases del proceso de unión a resinas de m⁷GTP: durante la incubación de los extractos con la resina (DTT Unión), o durante la elución de la resina en presencia de 1mM de 7mGTP libre (DTT Elución). La proteína procedente de los extractos totales (Ext. Tot.), la eluida (Eluciones) y la que tras la elución permaneció unida a la resina (Resinas CAP), fue analizada por geles nativos no desnaturizantes seguida de una visualización por *Western blot* empleando un anticuerpo anti-hCLE.

Para probar esta hipótesis ensayamos el efecto combinado del DTT en la unión y elución de hCLE de las resinas. Los resultados, analizados en geles desnaturizantes (**Figura 22 C**), muestran que la condición en la que se produce una mayor elución de hCLE de la resina es en la que la unión se ha realizado en ausencia de DTT, y la elución se ha realizado en presencia de DTT. Esto apoya la idea de que la

desestabilización de los complejos de alto peso molecular mediante agentes reductores disminuye su eficiencia de unión a análogos de 5'cap.

5. Estudio del papel de hCLE en Neuronas

El complejo hCLE-DDX1-HSPC117-Fam98B cumple los requisitos necesarios para ser un complejo de transporte de RNA de los que intervienen en traducción localizada. Como se

ha mencionado anteriormente, tanto hCLE como alguna de sus proteínas acompañantes habían sido identificadas anteriormente en proteómicas donde se analizaba la composición de distintos gránulos de transporte neuronales. Las neuronas suponen el mejor modelo para caracterizar este tipo de procesos y ofrecen grandes oportunidades para analizar las posibles funciones biológicas de los mismos. Por ello analizamos si el complejo de hCLE en el contexto neuronal se comporta del mismo modo que en células HEK293T, para avanzar en su conocimiento funcional y establecer un nexo entre el ámbito molecular y el celular.

5.1 El complejo de hCLE está conservado en neuronas y conserva su capacidad para unirse a resinas de análogos de 5' cap.

Primeramente analizamos si el complejo de hCLE está conservado en neuronas. Realizamos un *Western Blot* a partir de un extracto total de proteína neuronal. Empleamos cultivos primarios neuronales maduros obtenidos a partir del córtex de embriones de rata estado E-12 (embriones de 12 días de desarrollo). Los resultados (Figura 23 A, panel izquierdo) mostraron que el patrón de bandas reactivas contra hCLE en HEK293T se mantiene en neuronas, e incluso se acrecienta en los tamaños moleculares mayores de 50kDa. Para comprobar si estas bandas de mayores tamaños estaban relacionadas con hCLE o eran simplemente una reacción cruzada del anticuerpo, se efectuó un silenciamiento con

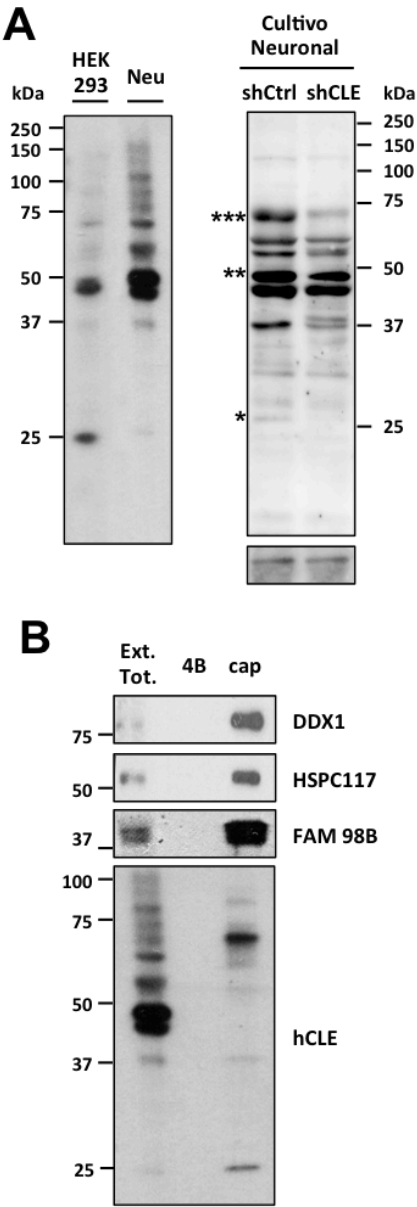


Figura 23: La proteína hCLE neuronal también une análogos de cap.

(A); Izquierda: extractos totales de células HEK293T o neuronas corticales de rata en cultivo (Neu) fueron analizadas por *Western Blot* empleando un anticuerpo contra hCLE. Derecha: extractos totales de cultivos neuronales de rata fueron infectados con lentivirus control (si.Ct) o lentivirus para el silenciamiento de hCLE (si.hCLE) y analizados por *Western Blot* con anticuerpo anti-hCLE. **(B);** Extractos totales de cultivos primarios neuronales fueron incubados con la resina control (4B) y resinas de análogo de cap (cap). Las proteínas retenidas en la resina fueron analizadas por *Western blot* empleando los anticuerpos indicados.

vectores lentivirales expresando el

silenciador control o el silenciador de hCLE (**Figura 23 A, panel derecho**). Los resultados mostraron que la mayoría de las bandas reactivas al anticuerpo de hCLE son sensibles al silenciador, siendo especialmente sensibles las bandas de 25 kDa (correspondientes al monómero de hCLE), 37kDa y una banda ligeramente menor 75 kDa que podría corresponder al trímero de hCLE.

A continuación analizamos si los componentes del complejo se asociaban a resinas de análogo de 5' cap. Los resultados (**Figura 23 B**) mostraron que el complejo hCLE-DDX1-HSPC117-Fam98B presentaba en neuronas un comportamiento análogo al que presenta en células HEK293, ya que tanto hCLE como los otros componentes del complejo se unieron al análogo de 5' cap, lo que sugiere que el complejo está conservado en este tipo celular. Es importante mencionar que en neuronas la banda mayoritaria de unión a los análogos de 5'cap es la que se presenta en el peso molecular inferior a 75kDa, es decir, la que corresponde al trímero de hCLE. Esto supone un cambio de estequiometría respecto a HEK293T, donde la banda mayoritaria es el monómero, aunque también se presenta unión de la banda de 70kDa, como se mostró en la **figura 20 B**.

5.2 El patrón de expresión y localización de hCLE sufre cambios durante el desarrollo neuronal

Las neuronas son células que requieren un complejo proceso de

maduración y especialización para llegar a ser funcionales. Muchas proteínas importantes para las actividades neuronales se expresan y localizan en momentos concretos del desarrollo en lugares determinados para cumplir su función. Así pues, si una proteína sufre una regulación especial de sus niveles o localización en un determinado momento de maduración de la neurona, es muy posible que cumpla cometidos especiales e importantes asignados a dicha etapa.

El modo más sencillo de simular los distintos estadios de desarrollo neuronal consiste en monitorizar cultivos primarios a distintos tiempos después de haber sido sembrados en placas. Este sistema es de gran utilidad dado que cuando se disocia y plaquea un cultivo primario neuronal, se induce a las neuronas a comenzar a crecer desde un estado totalmente inmaduro hasta un estado maduro donde las conexiones sinápticas ya han sido desarrolladas. Este proceso tiene lugar a lo largo de los primeros 15 días tras haber sembrado las neuronas. Por este motivo analizamos por inmunofluorescencia el patrón de expresión de hCLE a distintos tiempos después de haber sido realizado el cultivo (**Figura 24 A**), centrándonos en cambios en la localización de la proteína en distintos momentos del desarrollo. Como control utilizamos la proteína PSD95, que es

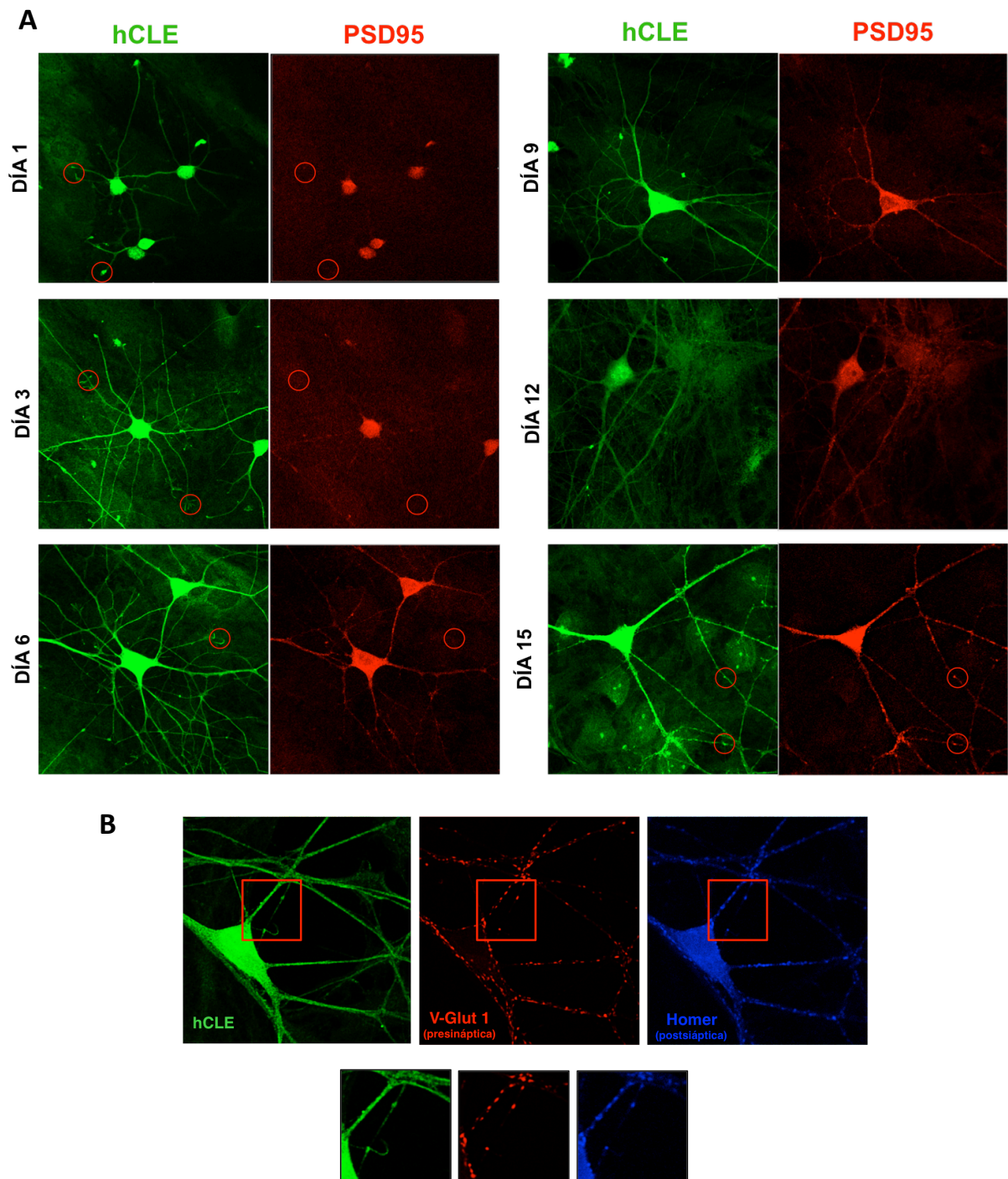


Figura 24: hCLE tiene un patrón de expresión diferencial dependiente del estadio de desarrollo neuronal y está presente en sinapsis activas.

(A); Inmunofluorescencia de hCLE (verde), y PSD95 (proteína expresada en neuronas, específica de sinapsis en neuronas maduras), en distintos estados de desarrollo de las neuronas en cultivo. Los cultivos celulares proceden de la disociación de hipocampos de ratas post-natales a día 0, sembrados en medio selectivo neuronal crecido sobre un monocultivo de astrocitos, y recogidos a 1, 3, 6, 9, 12 y 15 días de crecimiento *in vitro*.

(B); Inmunofluorescencia de hCLE (verde) en neuronas de cultivo hipocampal de ratas post-natales de día 0, realizadas tras 15 días de cultivo *in vitro*. V-Glut 1 (rojo) y Homer 1 (azul) fueron empleados como marcadores pre- y post-sinápticos respectivamente, para la identificación de sinapsis establecidas.

un marcador neuronal que en el estadio adulto sirve para marcar espinas dendríticas. Los resultados muestran que hCLE tiene un patrón de expresión ubicuo en neuronas, que varía en función de la etapa del desarrollo neuronal. En concreto, en neuronas en desarrollo (días 1, 3 y 6) hCLE presenta un enriquecimiento en los extremos de las neuritas y los conos de crecimiento de los axones, que en este último caso, recuerda al patrón propio de la F-Actina en el lamelipodio. En neuronas maduras (día 15), hCLE presenta un cierto patrón puntuado que sería compatible con su presencia en sinapsis, lo que concuerda con publicaciones anteriores mostrando que los gránulos de transporte de mRNA conteniendo hCLE en neuronas, iban dirigidos a espinas dendríticas para procesos de plasticidad sináptica (Kanai, Dohmae et al. 2004).

Para analizar con más detalle la presencia de hCLE en sinapsis utilizamos marcadores específicos neuronales. Como control de proteína presináptica empleamos la proteína V-Glut1, que se localiza en espinas dendríticas, y como marcador de proteína post-sináptica empleamos la proteína Homer1, que se localiza en botones presinápticos. Aquellos lugares en donde Homer y V-Glut aparecen juntas, indican la presencia de una sinapsis establecida. Los resultados (Figura 24 B) muestran que, aparte del patrón ubicuo de hCLE en el soma neuronal, en las dendritas y los axones hCLE presenta un patrón preferentemente puntuado que se localiza claramente en

algunas sinapsis establecidas. Estos resultados están de acuerdo con que los gránulos de hCLE en neuronas van dirigidos a zonas donde se están llevando a cabo procesos de plasticidad sináptica.

5.3 hCLE está enriquecido en sinaptosomas, pero no los otros componentes del complejo.

Para analizar bioquímicamente si hCLE estaba enriquecido en sinapsis, realizamos preparaciones de sinaptosomas a partir de tejido cortical de ratas adultas (3 meses), utilizando gradientes de sacarosa. Las preparaciones de sinaptosomas contienen gran parte de la densidad post-sináptica de las espinas dendríticas de la neurona post-sináptica, la totalidad del terminal sináptico de los axones de las neuronas presinápticas, y ciertos procesos membranosos procedentes de astrocitos, que interaccionan fuertemente con las sinapsis (Figura 25 A, panel superior). Como control de que las preparaciones de sinaptosomas se habían realizado correctamente analizamos, por *Western Blot*, proteínas propias de cada tipo de compartimento celular (Figura 25 A, panel inferior). PSD95 es una proteína post-sináptica muy enriquecida en la densidad post sináptica de las espinas dendríticas, sinaptofisina es una proteína pre-sináptica muy enriquecida en los botones presinápticos de los axones, y MAP2 es una proteína propia del soma neuronal, que no debe estar especialmente enriquecida en las sinapsis. Las diferencias en sus niveles confirmaron

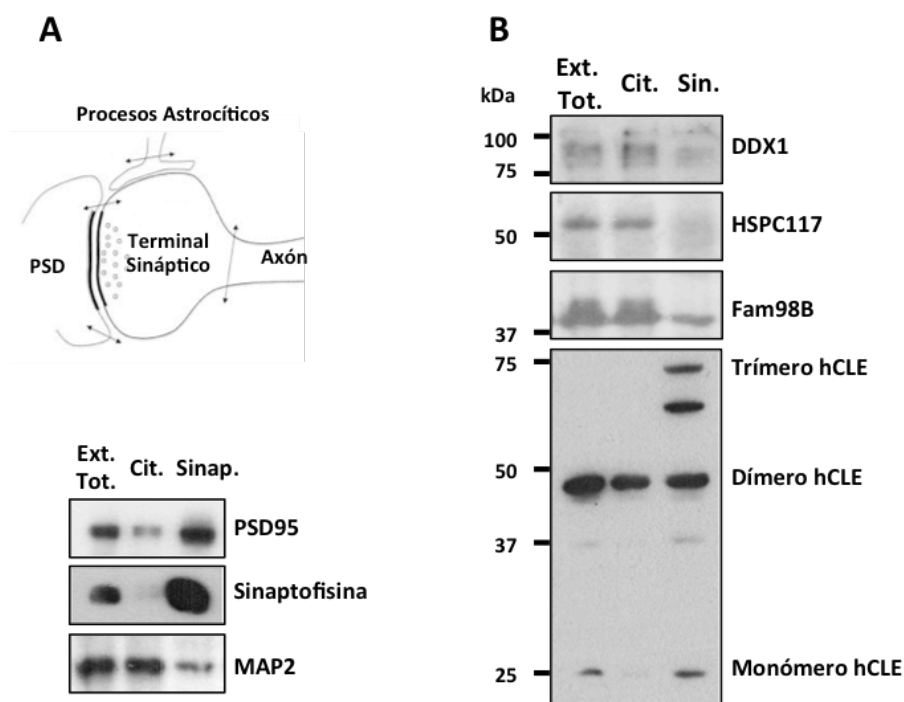


Figura 25: hCLE endógeno está enriquecido en sinaptosomas

(A); Panel superior: esquema mostrando las regiones celulares que se enriquecen en preparaciones de sinaptosomas. Las flechas negras indican los límites del contenido de la preparación (adaptada de PMC1618663). Panel inferior: análisis de Western Blot de proteínas control para las preparaciones de sinaptosomas en extractos totales de cerebro de rata adulta (Ext. Tot.) y tras el fraccionamiento en extracto citosólico libre de sinaptosomas (Cit.) o extracto enriquecido en sinaptosomas (Sin.). PSD95; proteína de la densidad post-sináptica 95 (marcador de la densidad post-sináptica). Sinaptofisina (marcador de los terminales pre-sinápticos). MAP2; proteína 2 asociada a los microtúbulos (proteína del citoesqueleto enriquecida en dendritas neuronales y soma, pero no en sinaptosomas). **(B);** Tejido cerebral de rata adulta procesado como se ha indicado anteriormente, del que se han analizado cantidades de proteína similares de extractos totales, extracto citoplasmático y extracto enriquecido en sinaptosomas. Revelado con anticuerpos contra las proteínas indicadas.

que las preparaciones de sinaptosomas habían funcionado correctamente.

Con estas mismas preparaciones realizamos un Western Blot contra hCLE y el resto de los miembros del complejo (**Figura 25 B**). Los resultados mostraron que tanto la banda monomérica de hCLE, como las bandas entre 50 y 75 kDa se encontraban enormemente enriquecidas en la fracción de los sinaptosomas. Sorprendentemente, el resto de los componentes del complejo de hCLE presentaban unos niveles más bajos en

la fracción sinaptosomal que en la fracción no sinaptosomal. Esto sugiere que en los sinaptosomas, el complejo de hCLE sufre cambios importantes respecto a lo que sucede en HEK293T y en el soma neuronal, disociándose.

5.4 Existen distintas poblaciones de hCLE en neuronas, correspondiendo mayoritariamente a complejos de alto peso molecular en sinaptosomas.

Dado que en HEK293T resultaban de gran importancia los complejos de alto peso

molecular de hCLE para favorecer su capacidad de unión a las resinas de análogos de 5'CAP, estudiamos el comportamiento de hCLE de las distintas fracciones subcelulares neuronales en distintas condiciones.

Los distintos extractos, cuya calidad fue comprobada con proteínas control por western blot (**Figura 26 A**) fueron no tratados (-) o tratados con agentes reductores (DTT) para disociar puentes disulfuro; fosfatasa alcalina (SAP) para excluir efectos dependientes de fosforilación; o RNasa para excluir implicación del RNA asociado a los complejos. A continuación caracterizamos su patrón de bandas en geles ajustando los niveles de proteína analizados por BCA (**Figura 26, panel izquierdo**). Los resultados muestran que hCLE se encuentra mayoritariamente en forma de dímero tanto en extractos totales como en la fracción no sinaptosomal, lo que concuerda con su abundancia en células neuronales. Complejos de mayor peso molecular, a la altura de 220 kDa, son observados tanto en condiciones control como en condiciones de tratamiento. Además, también se encuentra reactividad contra la proteína HSPC117 en estas preparaciones, lo que sugiere que se trata del complejo de hCLE. En contraste, el hCLE procedente de sinaptosomas se encuentra mayoritariamente en los tamaños de 50kDa, 65kDa y complejos de más de 250 kDa. Estos datos indican que hCLE en la fracción sináptica se comporta de modo diferente a hCLE de la fracción citoplasmática, lo que sugiere que el hCLE presente en sinapsis

podría ser predominantemente trimérico. Por otro lado en sinaptosomas también se hay bandas reactivas a pesos moleculares superiores que no han llegado a entrar adecuadamente en el gel y que se observan en los pocillos. No parece que los tratamientos con DTT, fosfatasa alcalina o RNasa afecten a la formación de los complejos de hCLE de forma notable, aunque HSPC117 sí parece que en presencia de fosfatasa alcalina, y, sobretodo, de RNasa, parece más eficazmente asociado al hCLE de las fracciones libres de sinaptosomas.

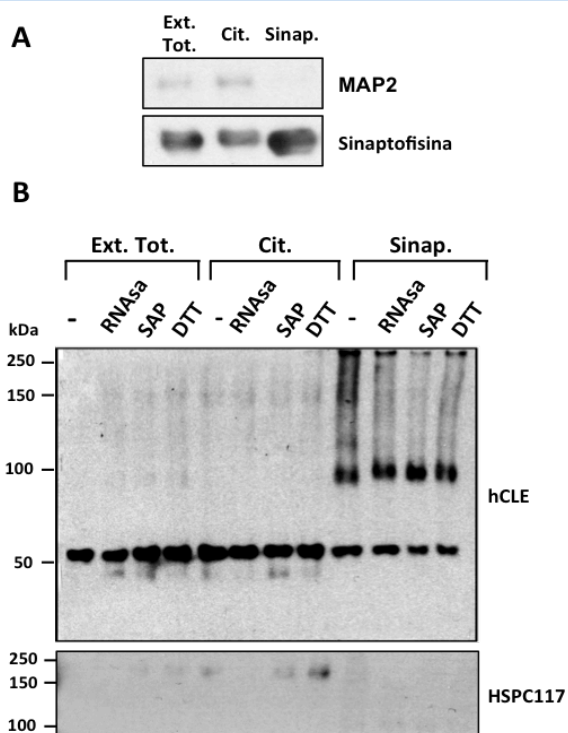


Figura 26: hCLE endógeno se encuentra distribuido en complejos de distinto peso molecular en función de la región subcelular neuronal donde se encuentre.

Cantidades equivalentes de extractos totales, citoplasmáticos y sinaptosomales (controlados en el panel derecho) fueron no tratados (-) o tratados con RNasa (RNasa), fosfatasa alcalina de gamba (SAP), o agentes reductores. Tras una electroforesis en geles nativos (no desnaturalizantes), hCLE y HSPC117 fueron analizados por Western blot.

A

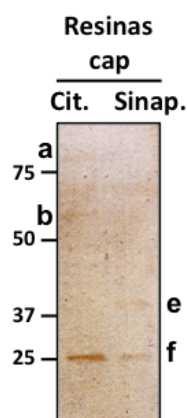


Figura 27: El complejo de hCLE une análogos de cap de forma diferencial en función del compartimento subcelular en el que se encuentre.

(A); Tinción de plata de las proteínas unidas a resinas de análogo de cap en extractos citoplasmáticos excluidos de sinaptosomas (Cit), y en extractos enriquecidos en sinaptosomas, procedentes de corteza cerebral de rata adulta. Las bandas visualizadas, marcadas con asterisco, fueron escindidas y analizadas por espectrometría de masas.

(B); Resultados de la espectrometría de masas de las bandas escindidas en la

porción unida a resinas de cada compartimento subcelular (Citoplasma, naranja; sinaptosomas, azul). **Nº de Acceso;** número de acceso de la proteína identificada con mayor intensidad sacada de la base de datos de proteína de NCBI (base de datos de proteínas no idénticas del NCBI), **Nombre;** nombre anotado de la proteína identificada, **MW(Da);** peso molecular nominal de cada una de las proteínas, **PI;** punto isoeléctrico de las proteínas, **Puntos;** puntuación de la proteína según el análisis Mascot. Este número refleja las puntuaciones combinadas de todos los espectros de masas que pueden ser alineados con las secuencias de aminoácidos dentro de dicha proteína. Una puntuación mayor indica un alineamiento de mayor confianza. **Num. Pept.;** número de péptidos alineados con la proteína de mayor puntuación identificada en la huella peptídica, **Cobertura;** porcentaje de la base de datos de la secuencia de la proteína cubierta por los péptidos alineados.

B

Extracto citoplasmático						
Nº Acceso	Nombre	MW (Da)	pI	Puntos (Score)	Num. Pept	Cobertura a
Q641Y8	a) Helicasa de RNA dependiente de ATP DDX1	83414	6,81	539	13	15,7
P63074	Factor de iniciación de traducción eucariota 4E	25266	5,79	206	5	21,7
Q61FV3	Queratina I citoesquelética 15	49011	4,8	191	5	7,6
Q61FU8	Queratina I citoesquelética 17	48378	4,97	145	4	7,2
Q61FW6	Queratina I citoesquelética 10	56699	5,1	209	4	6,7
P62804	Histona H4	11360	11,36	144	3	30,1
Q4FZU2	Queratina II citoesquelética 6A	59555	8,06	110	3	3,4
Q6AYT3	b) tRNA-splicing ligase RtcB homolog (HSPC117)	55727	6,77	90	3	8,3
Q61FV1	Queratina I citoesquelética 14	52936	5,08	124	3	6,4
P10719	ATP sintasa subunidad beta, mitocondrial	56318	5,19	144	2	7
P60711	Actina, citoplasmática 1	42052	5,29	77	2	13,9

Extracto sinaptosomal						
Nº Acceso	Nombre	MW (Da)	pI	Puntos (Score)	Num. Pept	Cobertura a
P13086	e) Succinil-CoA ligasa [ADP/GDP] subunidad alfa, mitocondrial	36524	9,54	280	6	20,5
Q61FW6	Queratina I citoesquelética 10	56699	5,1	276	6	11
P63074	f) Factor de iniciación de traducción eucariota 4E	25266	5,79	143	4	16,6
Q61FU8	Queratina I citoesquelética 17	48378	4,97	183	4	7,2
Q4FZU2	Queratina II citoesquelética 6A	59555	8,06	167	3	5,3
Q61G03	Queratina II citoesquelética 73	60977	8,17	142	3	4,9
Q61G05	Queratina II citoesquelética 75	59219	8,16	172	3	5
Q61MF3	Queratina II citoesquelética 1	65190	8	108	3	5
P0C169	Histona H2A tipo 1-C	14097	11,05	84	2	21,5
P60711	Actina, citoplasmática 1	42052	5,29	49	2	4,8
P97852	Enzima multifuncional del Peroxisoma tipo 2	79891	8,77	78	2	2,7
Q61G02	Queratina II citoesquelética 2 epidérmica	69484	7,58	95	2	3,2
Q9ESV6	Glicer aldehído-3-fosfato dehidrogenasa	47362	8,17	48	2	3,5

5.5 El hCLE presente en sinaptosomas no presenta capacidad de unión a 5' cap.

La característica potencialmente funcional más relevante del complejo de hCLE podría ser su capacidad de unirse a

estructuras de tipo cap para afectar a la traducción de mRNAs. Sin embargo en sinaptosomas el complejo se disocia, fenómeno que en HEK293T es sinónimo de pérdida de afinidad por el cap. Por ello quisimos analizar la capacidad de hCLE

procedente de extractos citoplasmáticos y sinaptosomales para unirse a resinas de m^7GTP . Con este objetivo realizamos una preparación de sinaptosomas y los extractos obtenidos, previamente ajustados por BCA, fueron incubados con resinas de m^7GTP o resinas control. Tras la incubación realizamos una tinción de plata y extraímos las bandas de proteínas visibles en la fracción unida a la resina, y las sometimos a un análisis proteómico (Figura 27 A). Este análisis confirmó que en el extracto citoplasmático, entre las proteínas mayoritariamente unidas a cap podíamos detectar HSPC117 y DDX1, junto a la proteína eIF4E, que empleamos como control de que la unión se había producido correctamente. Sin embargo, en el extracto de sinaptosomas no es detectable ningún miembro del complejo de hCLE, pero sí el factor eIF4E.

En paralelo, analizamos por *Western Blot* qué miembros del complejo se habían unido específicamente a las resinas de m^7GTP empleando de eIF4E como control. Los resultados (Figura 27 B) mostraron que en los extractos citoplasmáticos, tanto el monómero de hCLE como la banda de 70 kDa son capaces de unirse a las resinas de análogo de cap, siendo mayoritaria la unión de la banda de 70 kDa y el monómero de hCLE apenas perceptible. Además, el resto de miembros del complejo también son capaces de unirse específicamente a las resinas de m^7GTP y no a las resinas control (datos no mostrados). Por otro lado, en el extracto

sinaptosomal no es posible ver unión a las resinas de análogo de 5' cap de ninguno de los miembros del complejo. Tampoco es posible ver unión del monómero de hCLE. Tan solo es visible, pero en muy baja cantidad, la unión de la banda de 70 kDa. Sin embargo, el factor eIF4E mantiene intacta su capacidad de unión en ambos compartimentos. Estos datos resultan muy llamativos debido a que en el extracto citoplasmático los niveles de la banda de 70 kDa son imperceptibles, mientras que en las resinas de m^7GTP dicha banda del extracto citoplasmático se presenta altamente enriquecida. En contraste, en el input sinaptosomal la banda de 70 kDa está muy enriquecida respecto al input del extracto citoplasmático y sin embargo la unión a la resina de m^7GTP es muy ineficiente.

Estos datos sugieren que en sinaptosomas se produce algún tipo de cambio que altera la estequiometría del complejo a la vez que disminuye enormemente su capacidad de unir m^7GTP . Esto apoya la idea de que, aunque hCLE por sí sola es capaz de unirse a m^7GTP , requiere del resto de los miembros del complejo para que esta unión sea eficiente. De este modo, alterar la estabilidad del complejo y su estequiometría podría resultar un mecanismo de regulación de su capacidad de unión al 5' cap importante para los fenómenos de traducción localizada que tienen lugar en las sinapsis neuronales.

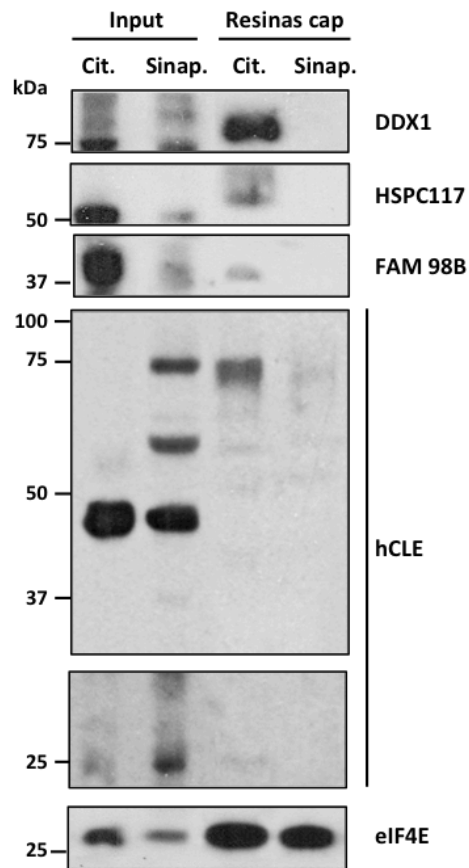
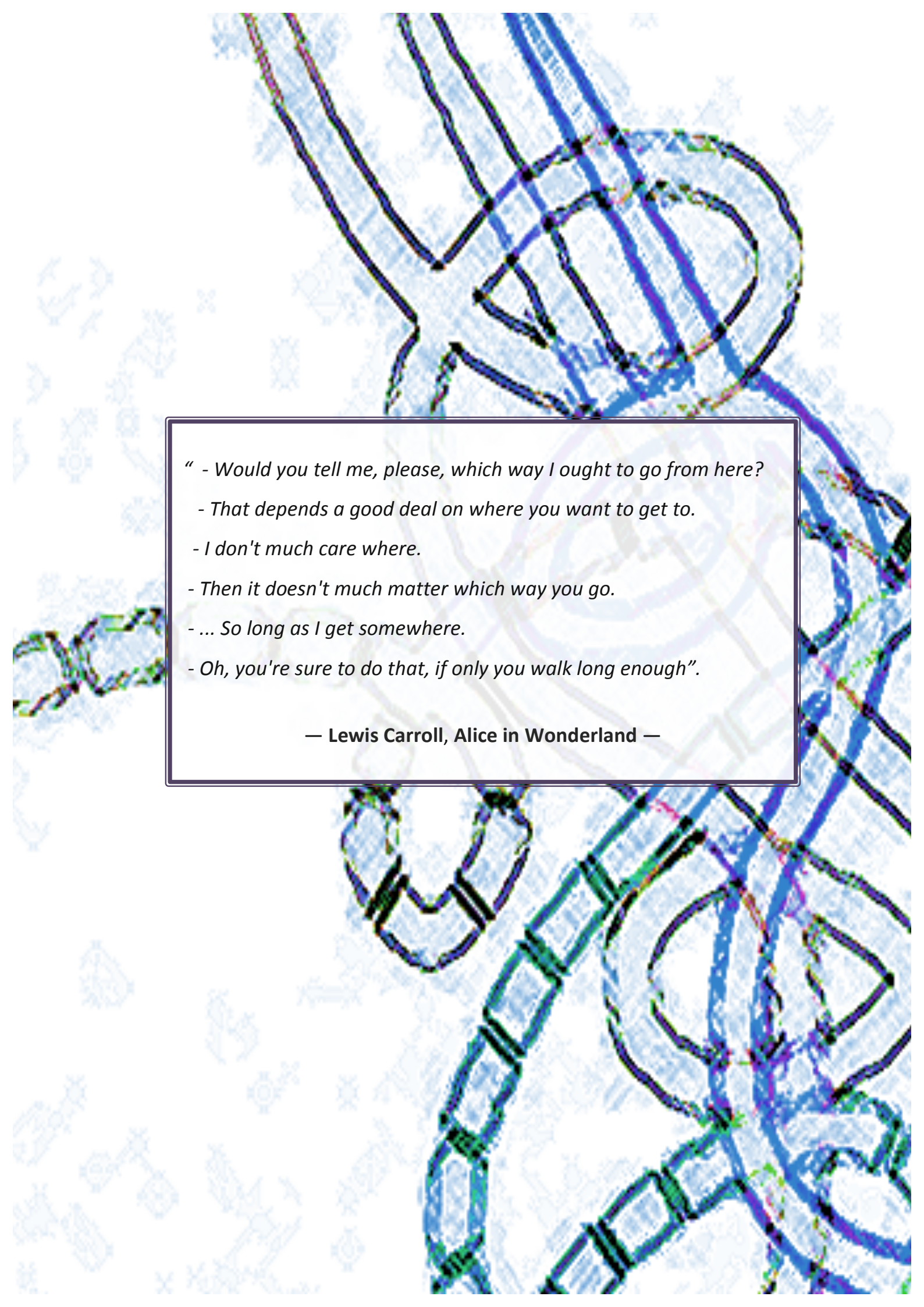


Figura 27: El complejo de hCLE une análogos de cap de forma diferencial en función del compartimento subcelular en el que se encuentre.

Cantidades idénticas de extractos citoplasmáticos libres de sinaptosomas (Cit) y extractos enriquecidos en sinaptosomas (Sin) fueron incubados con resinas de análogos de cap (Resinas de análogos de CAP). Los extractos totales y las proteínas unidas a la resina fueron analizadas por *Western Blot* con los anticuerpos indicados. * monómero, ** dímero, *** trímero.

- 
- “ - Would you tell me, please, which way I ought to go from here?*
- That depends a good deal on where you want to get to.
- I don't much care where.
- Then it doesn't much matter which way you go.
- ... So long as I get somewhere.
- Oh, you're sure to do that, if only you walk long enough”.

— Lewis Carroll, Alice in Wonderland —



DISCUSIÓN

Función endógena de hCLE

El ciclo de los RNAs depende de interacciones de distinta naturaleza entre RNAs y proteínas de unión a RNA, conformando ribonucleoproteínas (RNPs), complejos altamente dinámicos que están implicados en distintas fases del metabolismo del RNA. Las distintas RNPs dirigen y coordinan el destino de los RNAs que transportan y presentan distribuciones intracelulares asimétricas en función del proceso en el que esté involucrado su RNA cargo. Estos procesos pueden ser de distinta naturaleza, como degradación, traducción, almacenamiento en distintos gránulos de mRNA o localización subcelular para traducción localizada. Estos requerimientos hacen que, de hecho, el 70% de las especies de mRNA en la célula se encuentren asimétricamente distribuidas (Lecuyer, Yoshida et al. 2007), proceso en el cual contribuyen un gran número de proteínas de unión a RNA.

Aunque se desconocen los procesos mediante los que las RNPs se generan y distribuyen, se ha confirmado que existen ciertas características que la mayoría de las RNPs tienen en común, y que sugieren ciertos mecanismos de funcionamiento. Una de las más importantes es la presencia de proteínas nucleares en complejos de RNPs citoplasmáticos, lo que indica que la unión de proteínas específicas en el núcleo puede jugar un papel en el destino del RNA en el citoplasma. Una posible hipótesis sería que

esas proteínas nucleares de unión a RNA podrían conectar la localización citoplasmática del RNA con procesos más tempranos sucedidos en el núcleo, vinculados con fenómenos de biogénesis del RNA como la transcripción y el ensamblaje o *splicing*.

hCLE se encuentra presente en distintos estadios del ciclo de vida del mRNA, asociada a RNPs

hCLE se encuentra relacionada con el metabolismo del RNA a muy distintos niveles, que abarcan desde procesos nucleares de distinta índole, hasta mecanismos citoplasmáticos. Así se ha caracterizado que hCLE forma parte del núcleo central del complejo de proteínas que forma distintos tipos de gránulos citoplasmáticos de transporte de RNA (Kanai, Dohmae et al. 2004, Elvira, Wasiak et al. 2006, Miller, Blandford et al. 2009), también se ha visto que es parte del complejo de proteínas que constituye el *spliceosoma* (Rappsilber, Ryder et al. 2002) y del complejo de ensamblaje de la tRNA ligasa (Popow, Jurkin et al. 2014). Además hCLE interacciona con el enzima de adición de caperuza 5' cap del RNA 7SK (Jeronimo, Forget et al. 2007) y modula positivamente la transcripción dependiente de la RNAP II (Perez-Gonzalez, Rodriguez et al. 2006). Todas estas características sugieren un papel importante de hCLE en procesos de regulación del ciclo de vida de los RNAs. A parte de su papel como factor nuclear (Perez-Gonzalez, Rodriguez et al. 2006), hCLE podría estar participando en el metabolismo del

RNA en etapas posteriores ya citoplasmáticas. Si ese fuera el caso, hCLE debería estar asociado a proteínas implicadas tanto en procesos nucleares tales como la transcripción, el procesamiento del RNA y el transporte del núcleo al citoplasma, como a proteínas citoplasmáticas implicadas en mecanismos de traducción o metabolismo energético. Los experimentos de proteómica nos permitieron realizar la caracterización de proteínas asociadas a hCLE e indicaron que en el núcleo, hCLE establece interacciones con factores implicados en la síntesis y procesamiento del RNA, como el factor de transcripción 4 (TF4); hnRNP R, que funciona como co-activador transcripción del promotor c-fos (Fukuda, Shimada et al. 2013); o PABP1, una proteína a la cola de Poli-A de los mRNAs. Además, hCLE también interacciona con la proteína Nup153, esencial para la localización de Nup50 en el poro nuclear, cuya interacción con factores de transporte solubles resulta esencial para que ciertas vías de transporte núcleo-citoplasmático resulten eficientes (Makise, Mackay et al. 2012). Por otro lado, hCLE también interacciona, tanto en el núcleo como en el citoplasma, con proteínas relacionadas con el citoesqueleto y proteínas relacionadas con la traducción, que pertenecen a las subunidades ribosomales 40S y 60S (Tablas 3 y 4). Cabe destacar la presencia de la proteína nuclear de interacción con la proteína asociada al síndrome del cromosoma X-frágil (FMRP), llamada FIP-82 (Bardoni, Castets et al. 2003).

FMRP forma parte de complejos de mRNPs asociados a poli-ribosomas que se están transcribiendo activamente, y también está involucrada en el tráfico de complejos de RNA en neuritas y gránulos de RNA en el citoplasma (Stefani, Fraser et al. 2004) procesos de gran importancia para la función neuronal.

Las proteínas comunes que interaccionan con hCLE tanto en el núcleo como en el citoplasma resultan de gran interés para este trabajo y merecen una mención especial. Una de estas proteínas es la quinasa de la cadena ligera de la miosina II. Esta proteína fosforila la miosina II modulando su actividad como proteína motora, importante para los procesos de transporte activo a través del citoplasma celular (Ruiz-Loredo and Lopez-Colome 2012). Esto sugiere que los complejos citoplasmáticos que contienen hCLE pueden estar jugando un papel importante en el transporte entre el núcleo y el citoplasma, lo que está de acuerdo con la actividad tipo *shuttling* que se ha visto asociada a hCLE. Otras proteínas comunes que interaccionan con hCLE son DDX1, HSPC117 y Fam98B. DDX1 es una helicasa de RNA que une RNAs poliadenilados (Chen, Lin et al. 2002). HSPC117 y Fam98B se han visto asociadas junto con hCLE como parte principal del complejo de ensamblaje o *splicing* de la tRNA ligasa (Drewett, Molina et al. 2001, Popow, Englert et al. 2011, Popow, Jurkin et al. 2014). Además HSPC117 es un componente esencial para regular mecanismos de estrés de

respuesta a las proteínas desplegadas (UPR). Por su implicación en estos procesos, HSPC117 recientemente se ha visto que media neuroprotección dependiente del *splicing* alternativo del mensajero de XBP-1 (proteína 1 de unión a caja X) (Ray, Zhang et al. 2014). Por otro lado DDX1, Fam98B, HSPC117 y hCLE se han detectado en proteómicas de gránulos de transporte de RNA asociados a quinesina (Kanai, Dohmae et al. 2004), así como a complejos de proteínas asociadas a la formación de hidrogeles. Se ha visto que gran cantidad de complejos proteicos neuronales contienen proteínas en cuya secuencia peptídica predomina la aparición de una región de hélice superenrollada. Al ser purificadas, estas proteínas se agregan formando unos complejos amorfos de tipo gel, con un interior hidrofóbico y altamente inaccesible al medio externo. Ante cambios de temperatura y fosforilación, estos complejos son capaces de disgregarse rápidamente. Se cree que la presencia de este tipo de proteínas en los gránulos de RNA podrían suponer potenciales mecanismos de regulación de los procesos de ensamblaje y desensamblaje de las RNPs para bloquear y reactivar la traducción de los mensajeros que transportan (Han, Kato et al. 2012, Kato, Han et al. 2012).

Los resultados del análisis de las proteínas que interaccionan con hCLE sugieren que los gránulos que contienen hCLE suponen un nexo común entre las fases nucleares y citoplasmáticas del ciclo de vida del RNA. Sin embargo la conexión funcional

entre ambos tipos de complejos todavía se desconoce. No obstante, la presencia de elementos comunes en distintos tipos de RNPs sugiere que éstos complejos poseen una base o *core* de proteínas comunes, y sufren reordenamientos que adaptan su función y su distribución subcelular a distintas necesidades fisiológicas. En el caso de hCLE, las proteínas comunes en el núcleo y el citoplasma podrían estar conformando el núcleo del complejo, y las proteínas específicas de distintos compartimentos celulares estarían adaptando dichos complejos a distintos requerimientos funcionales.

hCLE es una proteína de tipo shuttling cuya re-entrada al núcleo es dependiente a transcripción activa

Los ensayos de hCLE con la proteína de fusión (hCLE-PAGFP) permitieron llevar a cabo ensayos *in vivo* que mostraron que hCLE es una proteína capaz de migrar del citoplasma al núcleo y del núcleo al citoplasma (desde ahora “movimiento tipo *shuttling*”) cuya entrada al núcleo es dependiente de transcripción activa. A nivel de secuencia, no existen en hCLE regiones consenso de localización nuclear (NLSs), pero sí que se pueden detectar señales de exportación nuclear (NES) que se localizan en la zona de la región carboxi-terminal que se ha predicho formando una hélice superenrollada posiblemente encargada de la dimerización de la proteína. Esta característica resulta interesante, porque

podría implicar que la dimerización de la proteína oculta la señal de salida del núcleo y ejerce un efecto en el movimiento núcleo-citoplasmático de hCLE. De este modo la dimerización de hCLE podría suponer una herramienta para regular su localización subcelular en ciertas condiciones. Sin embargo, los resultados obtenidos no apoyan esta hipótesis, dado que tanto el monómero como el dímero se encuentran tanto en el núcleo como en el citosol, y no hay especial enriquecimiento de uno sobre el otro en ninguno de los compartimentos.

Es relativamente común que las proteínas con movimiento tipo *shuttling* vean afectada su entrada al núcleo cuando la actividad de la RNAP II se ve inhibida (Pinol-Roma and Dreyfuss 1993). Este comportamiento se observa claramente con hCLE cuando las células son tratadas con el inhibidor de la transcripción Actinomicina D (Figura 9, Figura 10 A, B). Este tratamiento afecta, análogamente, a HSPC117 y a DDX1 (Figura 11 A, B). Entre las proteínas que requieren transcripción activa para su retorno al núcleo, podemos encontrar proteínas de unión a RNA que dependen de sus dominios de unión a RNA para realizar este movimiento, y pertenecen a familias de proteínas como la familia SR (dominios enriquecidos en Serina- Arginina) (ASF/SF2), o las hnRNPs, como hnRNPA1 (Caceres, Sreaton et al. 1998), (Delestienne, Wauquier et al. 2010). hCLE también ha sido descrita como proteína de unión a RNA, pero en su secuencia no existen motivos consenso para

este fin (Castello, Fischer et al. 2012). No obstante, programas de predicción de estructura como el Phyre² detectan ciertos residuos en ubicaciones concretas de la secuencia peptídica de hCLE que resultan buenos candidatos para unir RNAs. También existen numerosas proteínas cuya salida al citoplasma desde el núcleo se ve inhibida cuando se afecta la transcripción dependiente de la RNAPII. Un ejemplo de este tipo de comportamiento es la proteína y TAF15 (factor asociación a la unión de la caja TATA), una proteína de unión a RNA que se asocia a al factor de transcripción II D (TFIID) y a la RNA Polimerasa II (Bertolotti, Lutz et al. 1996). Las razones por las que existe una dependencia de transcripción activa para el movimiento tipo *shuttling* todavía no están claras, pero se cree que es debido a que estas RNPs conectan procesos metabólicos del RNA entre los compartimentos nuclear y citoplasmático, de modo que el movimiento entre ambos solo es requerido cuando se han sintetizado nuevos mRNA cargos que es necesario transportar.

En conjunto se puede concluir que, en muchos casos, las proteínas cuyo movimiento tipo *shuttling* depende de transcripción activa, son proteínas de unión a RNA que están implicadas en el transporte de RNA cargos recién sintetizados del núcleo al citoplasma, y a la vez, están implicadas en distintos procesos del metabolismo del RNA en el citoplasma. La dependencia de transcripción activa para el transporte de hCLE, junto con la presencia de proteínas

relacionadas con el citoesqueleto y proteínas ribosomales asociadas a hCLE purificado, apoyan un modelo en el que el complejo hCLE-DDX1-HSPC117-Fam98B citoplasmático entraría en el núcleo en condiciones de transcripción activa y una vez allí se asociaría con RNAs recién sintetizados mediando su transporte núcleo-citoplasmático, y subsecuentemente podría estar modulando la traducción de los RNAs asociados. Este modelo es compatible con un papel del complejo en procesos de traducción localizada.

hCLE dimeriza por un dominio de hélice super-enrollada y forma complejos funcionales con DDX1, HSPC117 y Fam98B

Como ya se ha expuesto, los datos de microscopía *in vivo* muestran que las proteínas acompañantes del complejo de hCLE: DDX1, HSPC117 y FAM98B, tienen un comportamiento análogo a hCLE en cuanto a su dependencia de transcripción activa para realizar su movimiento tipo *shuttling*. Por otro lado, el análisis de los tamaños de los complejos que contienen hCLE mediante cromatografía de exclusión muestra que estas proteínas se encuentran asociadas en complejos que migran en los mismos rangos de peso molecular. Esto es compatible con que hCLE, DDX1, HSPC117 y FAM98B se muevan entre el núcleo y el citoplasma como un complejo funcionalmente ligado. Todas ellas migran en complejos junto con proteínas ribosomales como el factor S6. El tamaño de estos complejos es dependiente

de la presencia de RNA. Sin embargo el tratamiento con RNasa no afecta significativamente a la interacción entre DDX1, HSPC117, Fam98B y hCLE, lo que sugiere que la asociación entre los miembros del complejo está mediada por interacciones proteína-proteína.

Los resultados de fraccionamiento de los extractos citosólicos indican que la forma de hCLE que es resistente a condiciones de desnaturalización (hCLE dimérico) no se asocia a DDX1, HSPC117 ni Fam98B, siendo el hCLE sensible a desnaturalización (hCLE monomérico) el que forma dichos complejos, al menos en este compartimento subcelular. Esto podría implicar que la dimerización de hCLE por la zona de hélice superenrollada evita la interacción de hCLE con el resto de las proteínas de complejo, quizá debido a que dicha interacción también está mediada por esta región. Resulta interesante destacar que la proteína Fam98B posee una estructura análoga a hCLE según estudios bioinformáticos ya publicados (Schou, Andersen et al. 2014). Estos estudios muestran que tanto hCLE como Fam98B poseen un dominio de hélice superenrollada en la zona amino-terminal. Es posible, por tanto, que Fam98B se encuentre compitiendo con hCLE para su interacción consigo misma, lo que podría suponer un mecanismo para regular la formación y la disociación del complejo.

Otro dato que apoya que hCLE, DDX1, HSPC117 y Fam98B formen un complejo ligado funcionalmente, es que el

silenciamiento de hCLE provoca una bajada tanto de DDX1, como de HSPC117 y Fam98B, que se recupera parcialmente cuando se recuperan los niveles de expresión de hCLE. Esto indica que la regulación de cada uno de los miembros del complejo está estrechamente ligada a la regulación de los demás. Este tipo de fenómeno ocurre en otros sistemas multiproteicos vinculados funcionalmente, como el complejo pequeño de la γ -tubulina (Fant, Gnadt et al. 2009) o el complejo de andamiaje HRD1-SEL1L de mamíferos (Iida, Fujimori et al. 2011).

Los RNAs unidos por hCLE tienen funciones relacionadas con el metabolismo energético y la traducción celular

Los datos de la secuenciación masiva de los RNAs asociados a hCLE (**Figura 15, Tabla 3**) muestran que hCLE se asocia a distintos tipos de RNAs implicados en distintas funciones. Además de los RNAs identificados implicados en función neuronal, sobre los que trataremos con más detalle en apartados posteriores, encontramos asociados a hCLE gran número de RNAs que codifican proteínas ribosomales y otros factores relacionados con los procesos de traducción, como el factor de iniciación de la traducción (eIF3) que juega un papel central regulando el ensamblaje de la subunidad ribosomal 40S sobre RNAs que poseen estructura 5' cap, posicionándolos en el lugar correcto para promover la formación del complejo de pre-iniciación (Hinnebusch 2006).

Además hCLE también une RNAs codificados por el genoma mitocondrial, tales como subunidades del complejo de la oxidoreductasa de NADH, subunidades del complejo de la oxidasa del citocromo C e incluso proteínas ribosomales codificadas por la mitocondria. Las mitocondrias se encuentran especialmente enriquecidas en regiones subcelulares donde tiene lugar un elevado gasto energético, como ocurre en muchas zonas de traducción localizada, y son esenciales para mantener los niveles adecuados de traducción (Ostroff, Fiala et al. 2002). En teoría, los mRNAs mitocondriales no salen de la mitocondria salvo que está sufra algún tipo de daño, de modo que detectarlos asociados a hCLE podría resultar paradójico. Sin embargo, se ha descrito que para que la traducción de los mensajeros mitocondriales tenga lugar es necesario que en las inmediaciones de la membrana mitocondrial se acoplen una serie de complejos transmembrana, denominados TOM (translocasa de la membrana externa) y TIM (translocasa de la membrana interna). Estos complejos permiten que ciertos mensajeros derivados del genoma nuclear esenciales para la traducción mitocondrial se recluten a dicha zona y se traduzcan localmente de modo que, a medida que son traducidos, los péptidos de nueva síntesis se translocan al otro lado de la membrana mitocondrial. En muchas ocasiones, estos mRNAs codifican proteínas del ribosoma mitocondrial. Las RNPs que transportan estos mensajeros nucleares a la mitocondria se

mueven mediante motores moleculares acoplados a quinesina, al igual que algunas de las RNPs neuronales donde se ha detectado la presencia de hCLE (Pfanner and Meijer 1997, Perry, Rimmer et al. 2008). Además, en proteómicas anteriores de nuestro grupo, se ha detectado la presencia del complejo TOM20 asociado a hCLE. Por esta razón creemos que durante su purificación hCLE podría arrastrar parte del complejo TOM, y por tanto mRNAs mitocondriales, lo que explicaría su detección en la secuenciación masiva.

También se han visto asociados a hCLE mRNAs de proteínas implicadas en el metabolismo de carbohidratos, como la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, la aldolasa y la fosfogluconolactonasa 6, de gran importancia para mantener el metabolismo energético, el potencial redox y los niveles de ATP. Estos resultados sugieren que hCLE podría ejercer una función reguladora de la traducción transportando específicamente mRNAs implicados en los procesos de traducción y su mantenimiento, que es muy costoso en términos energéticos. Además, hCLE también une su propio mRNA, lo cual podría suponer un mecanismo intrínseco de autorregulación de sus niveles en zonas concretas del citoplasma. Cabe destacar que la unión de su propio mensajero ha sido confirmada mediante inmunoprecipitación de la proteína endógena seguido de análisis por PCR cuantitativa (datos no mostrados).

hCLE modula positivamente la traducción de mRNAs

De acuerdo con los resultados anteriores, hCLE modula la traducción de proteínas en la célula. Los datos muestran que el tipo de mRNAs unidos por hCLE están implicados directamente en el metabolismo energético celular, siendo la traducción uno de los procesos celulares que demandan más energía. Por otro lado hCLE se encuentra asociada a proteínas implicadas con procesos de maduración, transporte y traducción de mRNAs y su silenciamiento tiene un gran efecto en la estabilidad de los complejos de los que forma parte. Consecuentemente los resultados de nuestros ensayos funcionales en condiciones de silenciamiento de hCLE han mostrado que la ausencia de hCLE reduce los niveles generales de traducción en la célula.

Esta inhibición podría deberse a una bajada en la eficiencia del transporte de los mRNAs del núcleo al citoplasma, a una bajada en la estabilidad de los mRNAs o a un descenso en la capacidad traducibilidad celular. Sin embargo, los resultados indican que ni el transporte general de mRNAs en la célula, ni la estabilidad general de los RNAs se ven afectados. No obstante, la traducibilidad del RNA sí que disminuye significativamente en condiciones de silenciamiento, lo que sugiere que hCLE está afectando de un modo directo a los procesos de traducción. Estos resultados son compatibles con los datos obtenidos de la secuenciación masiva donde se ve que hCLE une específicamente ciertos

mRNAs implicados, mayoritariamente, en el mantenimiento de los niveles de energía de la célula y en la actividad ribosomal. Sin embargo, los resultados de nuestra proteómica, proteómicas de otros grupos ya referenciadas y el movimiento tipo *shuttling* the hCLE sugerían que esta proteína tendría un papel en el transporte de los RNAs del núcleo al citoplasma, lo cual no hemos observado en nuestros resultados. En consecuencia, es posible que hCLE solo esté fomentando en el transporte y la estabilidad de sus mRNAs cargo específicos, no siendo observables estos efectos si analizamos el total de los mRNAs celulares. Así pues, la homeostasis y el transporte de los mRNAs específicos asociados a hCLE contribuiría a mantener el metabolismo energético y la maquinaria traduccional local en los niveles adecuados. En ausencia de hCLE, y por tanto del resto del complejo, no se mantendría la maquinaria traduccional en condiciones óptimas y podría resentirse la traducción general de la célula.

hCLE podría bloquear temporalmente la traducción de los mRNAs transportados en sus complejos

La traducción de los RNAs transportados en RNPs debe ser bloqueada temporalmente hasta que sea requerida en el lugar adecuado. El modelo actual asume que las proteínas del interior de la RNP mantienen a los RNAs enmascarados para impedir su traducción. Nuestros resultados de unión de hCLE a m⁷GTP sugieren que hCLE,

probablemente dentro del complejo hCLE-DDX1-HSPC117-FAM98B, podría estar contribuyendo a este mecanismo de enmascaramiento y previniendo la traducción de los mRNAs que transporta en sus RNPs.

En células HEK293T, hCLE así como sus proteínas acompañantes, une estructuras cap con mayor afinidad que el factor eIF4E, el factor citoplasmático de unión a cap convencional (Figura 20). Este factor es imprescindible para formar el complejo eIF4F que, mediante su interacción con el factor eIF3, recluta a la maquinaria traduccional al lugar donde se encuentra el mRNA unido a eIF4E a través de la estructura 5' cap (Sonenberg 2008). El hecho de que una proteína como hCLE, con una elevada afinidad por el 5' cap, esté presente en RNPs posiblemente implicadas en mecanismos de traducción localizada, podría indicar que sirve como herramienta para bloquear la iniciación de la traducción, protegiendo la estructura 5' cap del RNA de su unión con eIF4E. Este mecanismo de bloqueo debería estar actuando solo sobre los RNAs concretos unidos por el complejo, y no actuaría de modo general en todos los mRNAs.

Como se observó en la figura 21 hCLE reconoce m⁷GTP con una elevada afinidad y especificidad tan solo cuando éste se encuentra como mononucleótido (m⁷GTP) y no como dinucleótido (m⁷G-G), que es la estructura que más se asemeja a un RNA con estructura 5' cap. Esto sugiere que la afinidad por el m⁷GTP podría estar modulada por

elementos concretos de las secuencias de los mRNAs que el complejo une específicamente, en combinación con la actividad de otras proteínas del complejo. En estos momentos se está trabajando por identificar dichas estructuras por medio de herramientas bioinformáticas. Por otro lado, este experimento muestra que los dinucleótidos no metilados (G-G) son mejores competidores de la unión de hCLE por el 5' cap que los dinucleótidos metilados (m^7G -G), y casi tan buenos como el m^7GTP . Esto podría indicar que el complejo de hCLE está implicado en procesos de adición de las estructuras 5' cap de los mRNAs, de modo que presentaría gran afinidad por el m^7GTP libre y por los dinucleótidos no capeados (G-G) para reclutar los componentes necesarios para el proceso de añadidura del cap (el cap y el RNA sin la caperuza) y una vez añadida la estructura 5' cap, dicha afinidad disminuiría a fin de liberar al mRNA maduro, ya con la caperuza 5', para que prosiga con el resto de sus funciones. Aunque no disponemos de más datos funcionales que soporten esta hipótesis, resulta interesante mencionarla para tenerla en cuenta en futuras investigaciones.

Por otro lado, también resultan llamativos los elevados coeficientes de afinidad que presenta hCLE por la estructura 5' cap, cuya unión solo puede ser eficientemente competida a concentraciones muy elevadas de m^7GTP libre. Ello podría deberse a que, por motivos estructurales, el dominio de unión de hCLE al 5' cap se

encuentra en un bolsillo hidrofóbico inaccesible al competidor libre, de modo que solo una relajación de la estructura de la proteína podría reducir su eficiencia de unión. Este bolsillo hidrofóbico podría estar formado por efecto de la dimerización de hCLE, o en combinación con otras proteínas del complejo. Esta hipótesis sería compatible con las alteraciones de la capacidad de unión y elución de las resinas de m^7GTP que presenta hCLE en presencia de agentes reductores. Cabe destacar que ya existe un precedente ampliamente estudiado que une m^7GTP mediante un dominio bipartito compuesto por dos subunidades diferentes de proteína. En concreto esto ocurre con el complejo nuclear de unión a 5' cap, CBP20-CBP80 (Calero, Wilson et al. 2002). Teniendo en cuenta que la única población endógena de hCLE capaz de unir cap es aquella que co-eluye con el complejo (hCLE monomérico), que todos los miembros del complejo se unen a m^7GTP y que la proteína purificada, aunque une m^7GTP , lo hace con una afinidad muy inferior a la hCLE en presencia del complejo, es razonable pensar que es el complejo en su conjunto, el que une 5' cap de modo funcional.

Por tanto, todos estos datos sugieren que el complejo de hCLE ejerce una función importante en los mecanismos de unión a 5' cap y podría, a través de hCLE, regular la traducción de sus mRNAs cargo mediante la competición del 5' cap con el factor eIF4E, lo que supondría un interesante mecanismo de

regulación para los procesos de traducción localizada.

Posible función de hCLE en neuronas

La traducción localizada es un proceso muy complejo que resulta especialmente importante en células polarizadas como las neuronas (*Holt and Schuman 2013, Jung, Gkogkas et al. 2014*). Como ya se ha indicado anteriormente, los mecanismos de traducción localizada incluyen transporte de los mRNAs al lugar de destino y su traducción, en respuesta a estímulos específicos, procesos para los cuales es necesaria la coordinación de distintas actividades. En primer lugar, los mRNAs a transportar deben ser seleccionados para su empaquetamiento en complejos de RNPs, para lo cual también es necesaria la selección de ciertas proteínas de empaquetamiento. Estas RNPs deben interactuar con proteínas motoras del citoesqueleto, para permitir su transporte a lo largo del citoplasma hasta su destino final. Además, durante el transporte, la conformación de las RNPs debe resultar inaccesible a la maquinaria de traducción para evitar su traducción temprana antes de llegar al destino final. Por último, en respuesta a señales precisas, las RNPs deben reconfigurarse de modo que los RNAs cargo queden desenmascarados y puedan interactuar con la maquinaria traduccional.

Los procesos de traducción demandan grandes cantidades de energía, de modo que en el lugar de traducción se requiere la presencia de ribosomas y

procesos metabólicos de generación de energía. Atendiendo a este modelo, los resultados obtenidos para hCLE sugieren que podría estar jugando un papel importante en distintas actividades vinculadas a la traducción local. Dado que las neuronas suponen el mejor modelo celular para estudiar mecanismos de este tipo, analizamos el papel de hCLE en el contexto neuronal.

mRNAs asociados a hCLE y su implicación en neuronas

Estudios previos habían identificado a hCLE y otros miembros de su complejo en gránulos de RNAs en neuronas, transportando mRNAs como CaMKII α , Arc o β -actina, implicados en traducción localizada. Como se ha mencionado anteriormente, en la secuenciación masiva de mRNAs asociados a hCLE se identificaron varios mRNAs que codifican proteínas implicadas en función neuronal tanto a nivel de desarrollo, como a nivel de plasticidad sináptica y señalización neuronal. Aunque resulta llamativo que se obtengan mRNAs implicados en función neuronal a partir de células HEK293T, cabe destacar que ensayos transcriptómicos de este tipo celular han mostrado una gran proporción de mRNAs que normalmente se expresan en células neuronales (*Shaw 2001*) lo cual les confiere un fenotipo similar a líneas celulares neuronales como las células PC-12 (células de feocromocitoma de médula adrenal de rata) (*Greene and Tischler 1976*) o

Ntera-2 (células de carcinoma embrionario) (Pleasure and Lee 1993).

Varios de los mRNAs asociados a hCLE están implicados en el desarrollo de las neuritas, como por ejemplo el factor 2 promotor del crecimiento de neuritas (Winkler and Yao 2014) y el receptor sigma-1 (Takebayashi, Hayashi et al. 2004). También lleva numerosos mRNAs relacionados con el transporte iónico, que suelen ser de gran relevancia para procesos de señalización neuronal, como FXD1 (dominio FXD conteniendo el regulador de transporte iónico 5), que regula actividades de transporte transmembrana de iones de sodio y potasio cuya expresión en el cerebro es dependiente del estado de desarrollo y cuya desregulación provoca fallos en la homeostasis de la excitabilidad neuronal (Garcia-Rudaz, Deng et al. 2009). Otro de los mRNAs transportados por hCLE y relacionados con la actividad neuronal es el mensajero de TCTP (Proteína Tumoral Controlada Transcripcionalmente), cuya deficiencia afecta al desarrollo axonal en el sistema visual del embrión, debido a efectos sobre la homeostasis mitocondrial (Roque, Wong et al. 2016).

El papel de la mitocondria en procesos de desarrollo neuronal y la plasticidad sináptica está bien establecido. Las mitocondrias se encuentran muy enriquecidas en regiones subcelulares donde se produce un elevado consumo energético, como ocurre en los extremos de las neuritas en crecimiento, los botones presinápticos y

las espinas dendríticas. Esto pone de manifiesto que la producción local de energía resulta crucial para la actividad neuronal (Spillane, Ketschek et al. 2013, Aschrafi, Kar et al. 2016, Shigeoka, Jung et al. 2016). hCLE, como ya se ha mencionado anteriormente, une específicamente un gran número de RNAs mitocondriales, ribosomales y relacionados con el metabolismo de carbohidratos, los cuales podría transportar a lugares donde tiene lugar traducción localizada, lo que sugiere un papel importante de hCLE en este tipo de procesos. Normalmente, los mRNAs de traducción localizada codifican proteínas directamente relacionadas con mecanismos específicos de los lugares diana donde han de traducirse. Sin embargo hCLE parece transportar a estos lugares mRNAs de procesos celulares mucho más generales, como son el metabolismo energético, el metabolismo de carbohidratos o los mecanismos de traducción. Esto implica que hCLE podría estar actuando a nivel global en los distintos procesos celulares que requieren de traducción localizada, lo que supone un cambio de paradigma a la hora de entender los sistemas de regulación de la traducción local.

Localización de hCLE en las distintas etapas de desarrollo neuronal

Dada la asociación de hCLE con mRNAs con función neuronal, estudiamos la distribución y expresión de hCLE en las distintas etapas del desarrollo neuronal (Figura 24 A). Mediante análisis de

inmunofluorescencia observamos que en neuronas en desarrollo, hCLE presenta un enriquecimiento notable en zonas con elevada tasa de crecimiento como son los conos de crecimiento de los axones, los extremos de las dendritas y los filopodios neuronales. Durante el desarrollo neuronal estas zonas son objeto de complejos procesos de señalización que modifican la estructura del citoesqueleto favoreciendo el reconocimiento de señales químicas extracelulares que permiten a las neuritas detectar neuronas vecinas con las que conectarse. En estas zonas es esencial que se desencadenen procesos de traducción local de proteínas remodeladoras del citoesqueleto, y de canales iónicos destinados a modular la respuesta neuronal a los estímulos externos. Por otro lado, en neuronas maduras también se observa que hCLE muestra un patrón más puntuado distribuido a lo largo de las dendritas (**Figura 24 B**). Este enriquecimiento se produce en zonas donde existen sinapsis activas, de acuerdo a los marcadores neuronales empleados en los experimentos. Este tipo de patrón es el que suele observarse asociado a mecanismos de traducción localizada importantes para la plasticidad sináptica.

Durante el desarrollo neuronal también resulta esencial la polarización inicial de las neuronas, lo cual determina qué neuritas de las que crecen a partir del soma neuronal se convertirán en dendritas, y cuales se convertirán en axones. En la polarización de cualquier tipo celular juegan

un papel esencial los centrosomas. Como ya se ha indicado en la introducción, los centrosomas son grandes orgánulos multiproteicos que ayudan a posicionar el huso en el interior de la célula mediante la organización de sus microtúbulos. Con este tipo de procesos también ejercen una función clave regulando la polaridad y la movilidad celular (*Morgan 2007*). En este tipo de estructuras, la proteína hNineína se encuentra jugando un importante papel en el anclaje de los extremos negativos de los microtúbulos. Se ha visto que hCLE es capaz de interaccionar con hNineína bloqueando su fosforilación, proceso requerido para que ésta efectúe sus funciones de estabilización y posicionamiento de los microtúbulos (*Howng, Hsu et al. 2004*). hCLE por tanto, a parte de regular la traducción local en zonas energéticamente activas durante el desarrollo de las neuritas, podría estar implicada en procesos de desarrollo y polarización neuronal en etapas todavía más tempranas.

Posible función de hCLE en procesos de plasticidad sináptica

El patrón de hCLE observado en las inmunofluorescencias de neuronas maduras sugiere que hCLE podría estar formando parte de mecanismos de traducción localizada relacionados con procesos de plasticidad sináptica. Como ya se ha indicado, hCLE se encuentra en gránulos citoplasmáticos asociados a quinesina que transportan RNAs importantes para la

plasticidad sináptica a axones y dendritas. Se ha descrito que hCLE y staufer-1 forman parte de el núcleo de diversos gránulos neuronales de este tipo (Kanai, Dohmae et al. 2004). En el cerebro en desarrollo también se ha visto a hCLE formando parte de gránulos de traducción localizada, que a su vez transportan ribosomas y el motor molecular dineína (Elvira, Wasiak et al. 2006). Estudios proteómicos han mostrado que en este tipo de gránulos existen un gran número de proteínas del tipo DEAD box (familia a la que pertenece el miembro del complejo de hCLE, DDX1). De hecho, los gránulos que transportan hCLE pueden ser detectados utilizando como marcador la proteína DDX1 (Miller, Blandford et al. 2009). Además, en células HEK293T, hCLE está presente en inmunocomplejos de Staufer-1 (Villace, Marion et al. 2004) y de otras proteínas identificadas en los gránulos neuronales, como DDX1, HSPC117 y FAM98B, descritas en esta tesis, lo que sugiere que este tipo de complejos de los que forma parte hCLE están altamente conservados en distintos tipos celulares.

De nuevo, este repertorio heterogéneo de complejos que contienen hCLE sugiere que poseen una naturaleza dinámica e implica que distintos complejos funcionales tienen proteínas comunes y otras más específicas. La asociación-disociación de ciertas proteínas en estos complejos podría ser la fuerza moduladora de su función. hCLE está asociada con DDX1, HSPC117 y FAM98B en complejos como el de la ligasa de *splicing*

del tRNA (DDX1, HSPC117, FAM98B), el complejo del *spliceosoma* (DDX1), el complejo de staufer (DDX1), los gránulos de kinesina (DDX1, HSPC117) o los gránulos de dineína (DDX1, HSPC117). Por tanto, es posible que el complejo hCLE-DDX1-HSPC117-FAM98B esté también presente como unidad funcional en el contexto neuronal, lo cual se ha visto reforzado con los resultados de los ensayos de unión a resinas de m⁷GTP.

Unión al cap de hCLE en el contexto neuronal

En la caracterización inicial de unión a cap realizada en HEK293T mostramos que, en asociación con DDX1, HSPC117 y Fam98B hCLE se une a resinas de análogos de CAP (Figura 18). Esta unión también tiene lugar en células de cultivo neuronal (Figura 23) y en extractos totales de cerebro de rata (Figura 27). hCLE purificada, aparentemente libre de otras proteínas, mantiene la actividad de unión a cap (Figura 19) aunque esta se ve claramente reducida, lo que sugiere que el complejo hCLE-DDX1-HSPC117-FAM98B forman un complejo funcional de unión a CAP.

El hecho de que exista en gránulos de transporte de RNA una proteína capaz de unirse a CAP con mayor afinidad y especificidad que el factor 4E sugiere que dicha proteína podría encontrarse reforzando la inhibición de la traducción de RNA, protegiendo a la estructura cap de la unión con eIF4E. En preparaciones enriquecidas en sinaptosomas, donde la traducción activa es

requerida, las proteínas asociadas a hCLE no están enriquecidas y hCLE pierde la capacidad de unirse a estructuras tipo cap, mientras que eIF4E está presente y activa como proteína de unión a cap.

Estas propiedades nos han permitido sugerir un modelo de funcionamiento que tiene en cuenta el papel de esta proteína en traducción localizada neuronal (**Figura 28**). En el complejo hCLE-DDX1-HSPC117-FAM98B, hCLE se asocia a gránulos de transporte de RNA portando RNAs que codifican proteínas que ayudan a activar la traducción y la producción de energía mitocondrial. La actividad de unión a CAP del complejo debe ser controlada para prevenir la traducción de RNAs hasta que alcanzan su destino en las sinapsis. En respuesta a señales específicas, el complejo podría disociarse. Una vez hCLE se ha liberado de sus proteínas acompañantes, su capacidad de unión a cap estaría reducida, de modo que ya competiría con eIF4E por la estructura cap del RNA, que quedaría desenmascarada y lista interaccionar con eIF4E e iniciar la traducción.

El control traduccional de los mRNAs transportado a axones y dendritas es una

potente herramienta para inducir cambios rápidos a nivel de proteína en regiones distantes del soma, y tiene funciones muy importantes en polarización neuronal, crecimiento y plasticidad. Fluctuaciones aberrantes en la actividad traduccional llevan a enfermedades neurodegenerativas y del desarrollo neuronal (*Kelleher and Bear 2008, Liu-Yesucevitz, Bassell et al. 2011, Jung, Yoon et al. 2012, Ramaswami, Taylor et al. 2013*). Para alcanzar un conocimiento más profundo de la fisiología y de las actividades celulares en los procesos de plasticidad sináptica se requieren investigaciones que se centren en el estudio de los mecanismo moleculares que gobiernan la selección de RNAs y el ensamblaje y desensamblaje requeridos para la traducción localizada en un momento y lugar adecuados y precisos. A lo largo de esta tesis hemos discutido un gran número de vías alternativas para regular molecularmente la traducción local, y hemos añadido una nueva capa de complejidad a las distintas vías regulatorias que podrían estar operando en plasticidad neuronal.

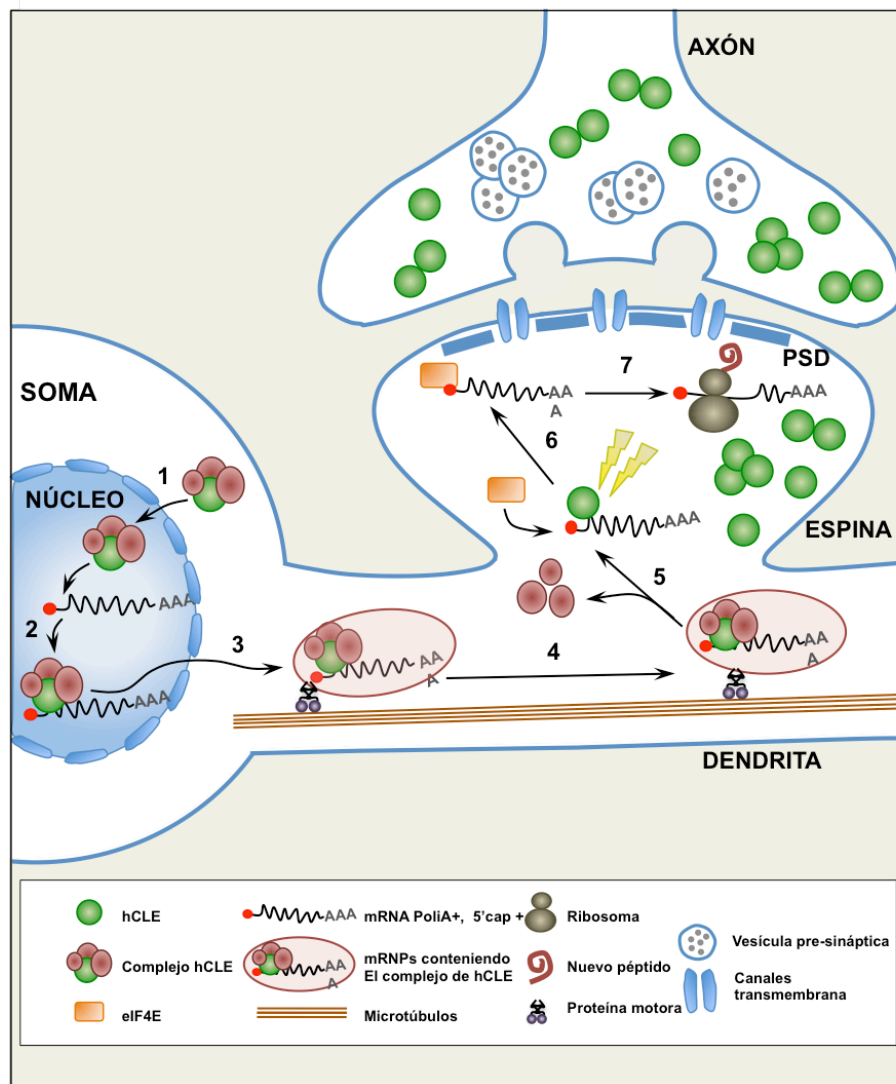



Figura 27: Modelo de funcionamiento de hCLE en neuronas: 1) El complejo de hCLE migra al interior de núcleos transcripcionalmente activos, 2) donde se ensambla con los RNAs que va a transportar. 3) El complejo citoplasmático de hCLE se ensambla en complejos de mayor peso molecular (mRNP) 4) que viajan a través del citoesqueleto por medio de sus proteínas motoras (Kanai, Dohmae et al. 2004, Elvira, Wasiak et al. 2006). Los RNAs transportados se mantienen enmascarados para evitar la traducción por medio de la actividad de unión a cap del complejo de hCLE. 5) En las proximidades del destino final de los RNAs transportados, señales específicas inducen el desensamblaje del mRNA. El complejo de hCLE se disocia y DDX1, HSPC117 y Fam98B no entran en las regiones sinaptosomales. 6) El hCLE disociado con baja capacidad de unión a cap permite interacciones del cap de los RNAs que transportaba con el factor eIF4E. 7) Esta interacción permite el reclutamiento de la maquinaria de iniciación de la traducción y por tanto la síntesis de aquellas proteínas específicas cuyos mRNAs habían sido transportados. 8) La forma trimérica de hCLE está altamente enriquecida en los compartimentos sinaptosomales, probablemente debido a los cambios conformacionales que sufre como fruto de su disociación.



"And once the storm is over, you won't remember how you made it through, how you managed to survive. You won't even be sure, whether the storm is really over. But one thing is certain. When you come out of the storm, you won't be the same person who walked in. That's what this storm's all about".

— Haruki Murakami —

The background of the slide is a deep space image. On the left side, there is a large, glowing blue nebula with some darker, filamentary structures. The rest of the background is a light blue-grey color, densely populated with numerous small, dark blue and black dots representing distant stars and galaxies.

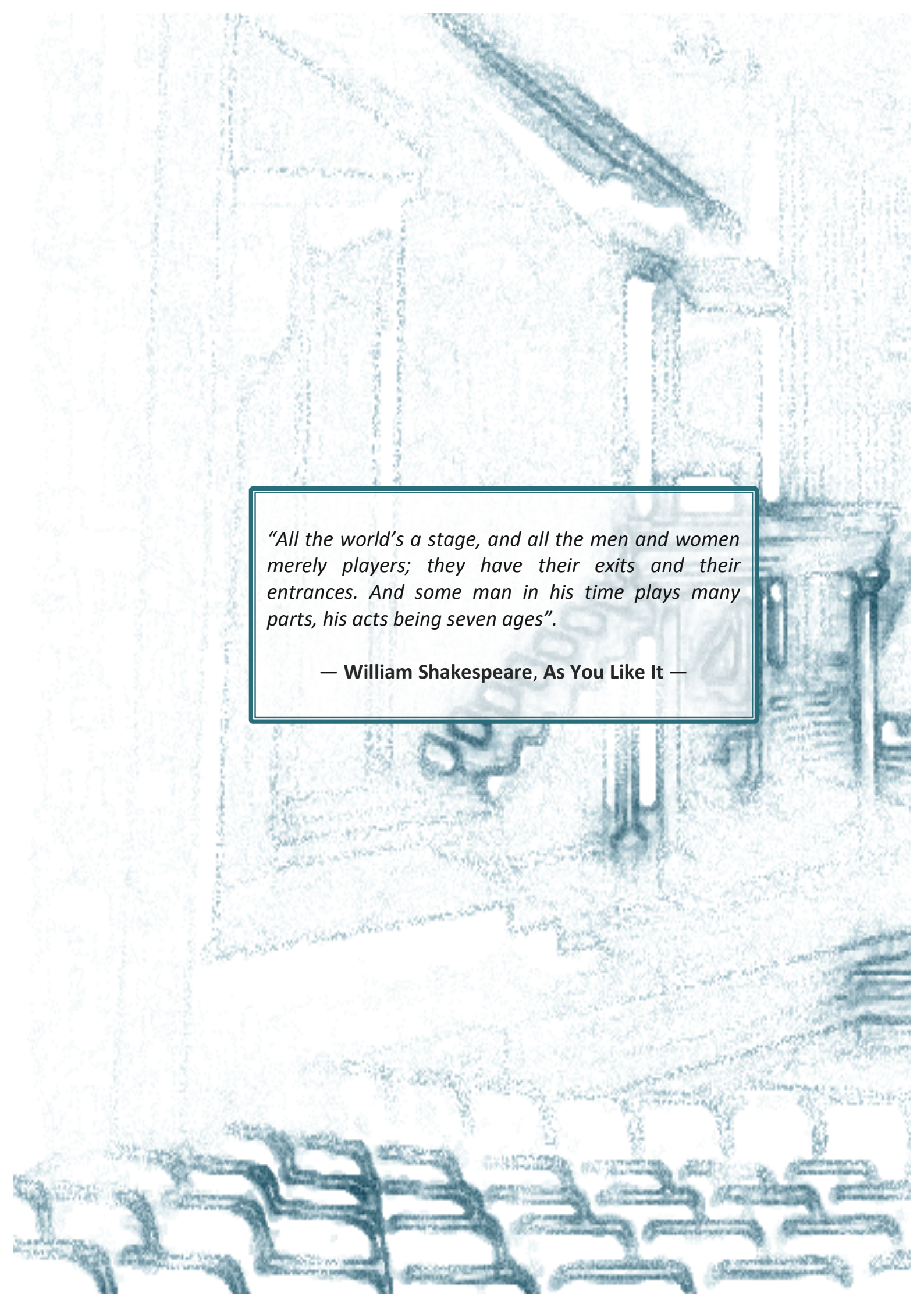
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. hCLE se asocia consigo misma formando dímeros y trímeros resistentes a condiciones desnaturalizantes por un dominio de hélice superenrollada en la región carboxi-terminal.
2. Las proteínas DDX1, HSPC117 y FAM98B se asocian a hCLE en los compartimentos nucleares y citoplasmáticos de células HEK293T, formando complejos con un peso molecular similar en ambos compartimentos. El hCLE dimérico citoplasmático no interacciona con DDX1-HSPC117-FAM98B.
3. hCLE, junto con DDX1-HSPC117-FAM98B es un complejo de tipo *shuttling* cuya re-entrada al núcleo es dependiente de transcripción activa.
4. Los RNAs más abundantes que se asocian con hCLE codifican proteínas relacionadas con procesos de traducción, metabolismo energético y función neuronal.
5. hCLE modula positivamente la traducción de RNAs, sin afectar al transporte general del mRNA en el interior de la célula.
6. hCLE posee capacidad de unión a cap en células HEK293T, células neuronales y extractos de tejido nervioso, y dicha unión es modulada por DDX1-HSPC117-FAM98B.
7. hCLE presenta un patrón de expresión que depende del estado de desarrollo neuronal. En neuronas inmaduras hCLE está enriquecida en conos de crecimiento y filopodios, y en neuronas maduras está enriquecida en sinapsis.
8. En sinapsis neuronales, donde hCLE está altamente enriquecido y libre de sus proteínas asociadas, hCLE carece de capacidad de unión a cap.

CONCLUSSIONS

1. hCLE associates with itself forming dimers and trimers resistant to denaturing conditions by a coiled-coil domain in the carboxi-terminal region.
2. Proteins DDX1, HSPC117 and FAM98B associate to hCLE in nuclear and cytoplasmic compartments in HEK293T cells, forming complexes with a similar molecular weight in both compartments. Cytoplasmic dimeric hCLE doesn't interact with DDX1-HSPC117-FAM98B.
3. hCLE, together with DDX1-HSPC117-FAM98B is a shuttling complex whose nuclear re-entry depends on active transcription.
4. The most abundant RNAs that are associated with hCLE codify proteins related to translation processes, energy metabolism and neuronal function.
5. hCLE positively modulates mRNA translation, but it is not affecting general mRNA transport inside the cell.
6. hCLE has cap binding activity in HEK293T cells, neuronal cells and brain tissue extracts, and this binding is modulated by DDX1-HSPC117-FAM98B.
7. hCLE presents an expression pattern that depends on neuronal developmental stages. In immature neurons hCLE is enriched in neuronal growth cones and filopodia, and in mature neurons it is enriched in already formed synapses.
8. In neuronal synapses, where hCLE is highly enriched and free of its associated proteins, lacks cap binding capacity.



*“All the world’s a stage, and all the men and women
merely players; they have their exits and their
entrances. And some man in his time plays many
parts, his acts being seven ages”.*

— William Shakespeare, As You Like It —



BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS BLIBLIOGRÁFICAS:

A

- Amado, R. G. and I. S. Chen (1999). "Lentiviral vectors--the promise of gene therapy within reach?" Science **285**(5428): 674-676.
- Anders, S., P. T. Pyl and W. Huber (2015). "HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data." Bioinformatics **31**(2): 166-169.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2008). "Stress granules: the Tao of RNA triage." Trends Biochem Sci **33**(3): 141-150.
- Andreassi, C. and A. Riccio (2009). "To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends." Trends Cell Biol **19**(9): 465-474.
- Aschrafi, A., A. N. Kar, J. R. Gale, A. G. Elkahloun, J. N. Vargas, N. Sales, G. Wilson, M. Tompkins, A. E. Gioio and B. B. Kaplan (2016). "A heterogeneous population of nuclear-encoded mitochondrial mRNAs is present in the axons of primary sympathetic neurons." Mitochondrion **30**: 18-23.
- Aschrafi, A., O. Natera-Naranjo, A. E. Gioio and B. B. Kaplan (2010). "Regulation of axonal trafficking of cytochrome c oxidase IV mRNA." Mol Cell Neurosci **43**(4): 422-430.

B

- Banuelos, S., M. Saraste and K. Djinovic Carugo (1998). "Structural comparisons of calponin homology domains: implications for actin binding." Structure **6**(11): 1419-1431.
- Bardoni, B., M. Castets, M. E. Huot, A. Schenck, S. Adinolfi, F. Corbin, A. Pastore, E. W. Khandjian and J. L. Mandel (2003). "82-FIP, a novel FMRP (fragile X mental retardation protein) interacting protein, shows a cell cycle-dependent intracellular localization." Hum Mol Genet **12**(14): 1689-1698.
- Benjamini, Y., D. Drai, G. Elmer, N. Kafkafi and I. Golani (2001). "Controlling the false discovery rate in behavior genetics research." Behav Brain Res **125**(1-2): 279-284.
- Bertolotti, A., Y. Lutz, D. J. Heard, P. Chambon and L. Tora (1996). "hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II." EMBO J **15**(18): 5022-5031.
- Bienroth, S., W. Keller and E. Wahle (1993). "Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex." EMBO J **12**(2): 585-594.
- Boland, A., F. Tritschler, S. Heimstadt, E. Izaurralde and O. Weichenrieder (2010). "Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein." EMBO Rep **11**(7): 522-527.
- Bradrick, S. S. and M. Gromeier (2009). "Identification of gemin5 as a novel 7-methylguanosine cap-binding protein." PLoS One **4**(9): e7030.

- Bramham, C. R. and D. G. Wells (2007). "Dendritic mRNA: transport, translation and function." Nat Rev Neurosci **8**(10): 776-789.
- Bregues, M., D. Teixeira and R. Parker (2005). "Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies." Science **310**(5747): 486-489.
- Buchan, J. R. and R. Parker (2009). "Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation." Mol Cell **36**(6): 932-941.
- Buckley, P. T., M. T. Lee, J. Y. Sul, K. Y. Miyashiro, T. J. Bell, S. A. Fisher, J. Kim and J. Eberwine (2011). "Cytoplasmic intron sequence-retaining transcripts can be dendritically targeted via ID element retrotransposons." Neuron **69**(5): 877-884.
- Buffington, S. A., W. Huang and M. Costa-Mattioli (2014). "Translational control in synaptic plasticity and cognitive dysfunction." Annu Rev Neurosci **37**: 17-38.
- Buxbaum, A. R., B. Wu and R. H. Singer (2014). "Single beta-actin mRNA detection in neurons reveals a mechanism for regulating its translatability." Science **343**(6169): 419-422.
- C**
- Caceres, J. F., G. R. Screaton and A. R. Krainer (1998). "A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm." Genes Dev **12**(1): 55-66.
- Calero, G., K. F. Wilson, T. Ly, J. L. Rios-Steiner, J. C. Clardy and R. A. Cerione (2002). "Structural basis of m7GpppG binding to the nuclear cap-binding protein complex." Nat Struct Biol **9**(12): 912-917.
- Campbell, D. S. and C. E. Holt (2001). "Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation." Neuron **32**(6): 1013-1026.
- Castello, A., B. Fischer, K. Eichelbaum, R. Horos, B. M. Beckmann, C. Strein, N. E. Davey, D. T. Humphreys, T. Preiss, L. M. Steinmetz, J. Krijgsveld and M. W. Hentze (2012). "Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins." Cell **149**(6): 1393-1406.
- Cheang, T. Y., H. Y. Zhou, W. Chen, B. Zhang, L. Liu, J. Yang, S. Wang and H. Li (2016). "C14orf166 overexpression correlates with tumor progression and poor prognosis of breast cancer." J Transl Med **14**(1): 54.
- Chen, C. H., W. C. Yu, T. Y. Tsao, L. Y. Wang, H. R. Chen, J. Y. Lin, W. Y. Tsai and S. C. Cheng (2002). "Functional and physical interactions between components of the Prp19p-associated complex." Nucleic Acids Res **30**(4): 1029-1037.
- Chen, H. C., W. C. Lin, Y. G. Tsay, S. C. Lee and C. J. Chang (2002). "An RNA helicase, DDX1, interacting with poly(A) RNA and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K." J Biol Chem **277**(43): 40403-40409.
- Chen, M., Y. Ye, B. Zou, S. Guo, F. Zhou, K. Lu, J. Liu, Z. Xu, H. Han, Z. Liu, Y. Li, K. Yao, C. Liu and Z. Qin (2016). "C14orf166 is a high-risk biomarker for bladder cancer and promotes bladder cancer cell proliferation." J Transl Med **14**(1): 55.
- Cheng, H., K. Dufu, C. S. Lee, J. L. Hsu, A. Dias and R. Reed (2006). "Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA." Cell **127**(7): 1389-1400.

Chung, W. H., J. L. Craighead, W. H. Chang, C. Ezeokonkwo, A. Bareket-Samish, R. D. Kornberg and F. J. Asturias (2003). "RNA polymerase II/TFIIF structure and conserved organization of the initiation complex." *Mol Cell* **12**(4): 1003-1013.

Coppola, J. A., A. S. Field and D. S. Luse (1983). "Promoter-proximal pausing by RNA polymerase II in vitro: transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(5): 1251-1255.

Costa-Mattioli, M., W. S. Sossin, E. Klann and N. Sonenberg (2009). "Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory." *Neuron* **61**(1): 10-26.

Coutts, M., A. Krowczynska and G. Brawerman (1993). "Protection of mRNA against nucleases in cytoplasmic extracts of mouse sarcoma ascites cells." *Biochim Biophys Acta* **1173**(1): 49-56.

Cui, Y., J. Wu, M. Zong, G. Song, Q. Jia, J. Jiang and J. Han (2009). "Proteomic profiling in pancreatic cancer with and without lymph node metastasis." *Int J Cancer* **124**(7): 1614-1621.

D

Delestienne, N., C. Wauquier, R. Soin, J. F. Dierick, C. Gueydan and V. Kruys (2010). "The splicing factor ASF/SF2 is associated with TIA-1-related/TIA-1-containing ribonucleoproteic complexes and contributes to post-transcriptional repression of gene expression." *FEBS J* **277**(11): 2496-2514.

Drewett, V., H. Molina, A. Millar, S. Muller, F. von Hesler and P. E. Shaw (2001). "DNA-bound transcription factor complexes analysed by mass-spectrometry: binding of novel proteins to the human c-fos SRE and related sequences." *Nucleic Acids Res* **29**(2): 479-487.

E

Elvira, G., S. Wasiak, V. Blandford, X. K. Tong, A. Serrano, X. Fan, M. del Rayo Sanchez-Carbente, F. Servant, A. W. Bell, D. Boismenu, J. C. Lacaille, P. S. McPherson, L. DesGroseillers and W. S. Sossin (2006). "Characterization of an RNA granule from developing brain." *Mol Cell Proteomics* **5**(4): 635-651.

Emmott, E., D. Munday, E. Bickerton, P. Britton, M. A. Rodgers, A. Whitehouse, E. M. Zhou and J. A. Hiscox (2013). "The cellular interactome of the coronavirus infectious bronchitis virus nucleocapsid protein and functional implications for virus biology." *J Virol* **87**(17): 9486-9500.

F

Fant, X., N. Gnadt, L. Haren and A. Merdes (2009). "Stability of the small gamma-tubulin complex requires HCA66, a protein of the centrosome and the nucleolus." *J Cell Sci* **122**(Pt 8): 1134-1144.

Fodor, E. (2013). "The RNA polymerase of influenza A virus: mechanisms of viral transcription and replication." *Acta Virol* **57**(2): 113-122.

Frank, F., M. R. Fabian, J. Stepinski, J. Jemielity, E. Darzynkiewicz, N. Sonenberg and B. Nagar (2011). "Structural analysis of 5'-mRNA-cap interactions with the human AGO2 MID domain." *EMBO Rep* **12**(5): 415-420.

Fuerst, T. R., P. L. Earl and B. Moss (1987). "Use of a hybrid vaccinia virus-T7 RNA polymerase system for expression of target genes." *Mol Cell Biol* **7**(7): 2538-2544.

Fukuda, A., M. Shimada, T. Nakadai, K. Nishimura and K. Hisatake (2013). "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R cooperates with mediator to facilitate transcription reinitiation on the c-Fos gene." PLoS One **8**(8): e72496.

G

Gagnon, J. A. and K. L. Mowry (2011). "Molecular motors: directing traffic during RNA localization." Crit Rev Biochem Mol Biol **46**(3): 229-239.

Garaigorta, U., A. M. Falcon and J. Ortin (2005). "Genetic analysis of influenza virus NS1 gene: a temperature-sensitive mutant shows defective formation of virus particles." J Virol **79**(24): 15246-15257.

Garcia-Rudaz, C., V. Deng, V. Matagne, O. Ronnekleiv, M. Bosch, V. Han, A. K. Percy and S. R. Ojeda (2009). "FX1D1, a modulator of Na(+),K(+)-ATPase activity, facilitates female sexual development by maintaining GnRH neuronal excitability." J Neuroendocrinol **21**(2): 108-122.

Gebhardt, A., M. Habjan, C. Benda, A. Meiler, D. A. Haas, M. Y. Hein, A. Mann, M. Mann, B. Habermann and A. Pichlmair (2015). "mRNA export through an additional cap-binding complex consisting of NCBP1 and NCBP3." Nat Commun **6**: 8192.

Gilmartin, G. M. (2005). "Eukaryotic mRNA 3' processing: a common means to different ends." Genes Dev **19**(21): 2517-2521.

Gkogkas, C., N. Sonenberg and M. Costa-Mattioli (2010). "Translational control mechanisms in long-lasting synaptic plasticity and memory." J Biol Chem **285**(42): 31913-31917.

Gonsalvez, G. B., C. R. Urbinati and R. M. Long (2005). "RNA localization in yeast: moving towards a mechanism." Biol Cell **97**(1): 75-86.

Goodrich, J. A. and R. Tjian (1994). "TBP-TAF complexes: selectivity factors for eukaryotic transcription." Curr Opin Cell Biol **6**(3): 403-409.

Greene, L. A. and A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(7): 2424-2428.

Grunwald, D. and R. H. Singer (2010). "In vivo imaging of labelled endogenous beta-actin mRNA during nucleocytoplasmic transport." Nature **467**(7315): 604-607.

Guilligay, D., F. Tarendeau, P. Resa-Infante, R. Coloma, T. Crepin, P. Sehr, J. Lewis, R. W. Ruigrok, J. Ortin, D. J. Hart and S. Cusack (2008). "The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2." Nat Struct Mol Biol **15**(5): 500-506.

Gustafson, E. A. and G. M. Wessel (2010). "DEAD-box helicases: posttranslational regulation and function." Biochem Biophys Res Commun **395**(1): 1-6.

H

Haegeman, G. and W. Fiers (1978). "Localization of the 5' terminus of late SV40 mRNA." Nucleic Acids Res **5**(7): 2359-2371.

- Hamm, J. and I. W. Mattaj (1990). "Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus." Cell **63**(1): 109-118.
- Han, T. W., M. Kato, S. Xie, L. C. Wu, H. Mirzaei, J. Pei, M. Chen, Y. Xie, J. Allen, G. Xiao and S. L. McKnight (2012). "Cell-free formation of RNA granules: bound RNAs identify features and components of cellular assemblies." Cell **149**(4): 768-779.
- Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." Genes Dev **18**(16): 1926-1945.
- Hinnebusch, A. G. (2006). "eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes." Trends Biochem Sci **31**(10): 553-562.
- Hodel, A. E., P. D. Gershon and F. A. Quijcho (1998). "Structural basis for sequence-nonspecific recognition of 5'-capped mRNA by a cap-modifying enzyme." Mol Cell **1**(3): 443-447.
- Holt, C. E. and E. M. Schuman (2013). "The central dogma decentralized: new perspectives on RNA function and local translation in neurons." Neuron **80**(3): 648-657.
- Howng, S. L., H. C. Hsu, T. S. Cheng, Y. L. Lee, L. K. Chang, P. J. Lu and Y. R. Hong (2004). "A novel ninein-interaction protein, CGI-99, blocks ninein phosphorylation by GSK3 β and is highly expressed in brain tumors." FEBS Lett **566**(1-3): 162-168.
- Hsu, C. L. and A. Stevens (1993). "Yeast cells lacking 5'→3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure." Mol Cell Biol **13**(8): 4826-4835.
- Huang, S. and D. L. Spector (1991). "Nascent pre-mRNA transcripts are associated with nuclear regions enriched in splicing factors." Genes Dev **5**(12A): 2288-2302.
- Huarte, M., J. J. Sanz-Ezquerro, F. Roncal, J. Ortín and A. Nieto (2001). "PA Subunit from Influenza Virus Polymerase Complex Interacts with a Cellular Protein with Homology to a Family of Transcriptional Activators." J Virol **75**(18): 8597-8604.
- Huttelmaier, S., D. Zenklusen, M. Lederer, J. Dichtenberg, M. Lorenz, X. Meng, G. J. Bassell, J. Condeelis and R. H. Singer (2005). "Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1." Nature **438**(7067): 512-515.
- Iida, Y., T. Fujimori, K. Okawa, K. Nagata, I. Wada and N. Hosokawa (2011). "SEL1L protein critically determines the stability of the HRD1-SEL1L endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) complex to optimize the degradation kinetics of ERAD substrates." J Biol Chem **286**(19): 16929-16939.
- Inge-Vechtomov, S., G. Zhouravleva and M. Philippe (2003). "Eukaryotic release factors (eRFs) history." Biol Cell **95**(3-4): 195-209.
- Izaurralde, E., J. Lewis, C. McGuigan, M. Jankowska, E. Darzynkiewicz and I. W. Mattaj (1994). "A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing." Cell **78**(4): 657-668.
- Izaurralde, E., J. Stepinski, E. Darzynkiewicz and I. W. Mattaj (1992). "A cap binding protein that may mediate nuclear export of RNA polymerase II-transcribed RNAs." J Cell Biol **118**(6): 1287-1295.

J

Jain, S. and R. Parker (2013). "The discovery and analysis of P Bodies." Adv Exp Med Biol **768**: 23-43.

Jankowsky, E. (2011). "RNA helicases at work: binding and rearranging." Trends Biochem Sci **36**(1): 19-29.

Jeronimo, C., D. Forget, A. Bouchard, Q. Li, G. Chua, C. Poitras, C. Therien, D. Bergeron, S. Bourassa, J. Greenblatt, B. Chabot, G. G. Poirier, T. R. Hughes, M. Blanchette, D. H. Price and B. Coulombe (2007). "Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme." Mol Cell **27**(2): 262-274.

Jung, H., C. G. Gkogkas, N. Sonenberg and C. E. Holt (2014). "Remote control of gene function by local translation." Cell **157**(1): 26-40.

Jung, H., B. C. Yoon and C. E. Holt (2012). "Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair." Nat Rev Neurosci **13**(5): 308-324.

K

Kanai, Y., N. Dohmae and N. Hirokawa (2004). "Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule." Neuron **43**(4): 513-525.

Kato, M., T. W. Han, S. Xie, K. Shi, X. Du, L. C. Wu, H. Mirzaei, E. J. Goldsmith, J. Longgood, J. Pei, N. V. Grishin, D. E. Frantz, J. W. Schneider, S. Chen, L. Li, M. R. Sawaya, D. Eisenberg, R. Tycko and S. L. McKnight (2012). "Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels." Cell **149**(4): 753-767.

Kedersha, N., G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M. J. Fritzler, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. E. Golan and P. Anderson (2005). "Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling." J Cell Biol **169**(6): 871-884.

Keiler, K. C. (2011). "RNA localization in bacteria." Curr Opin Microbiol **14**(2): 155-159.

Kelleher, R. J., 3rd and M. F. Bear (2008). "The autistic neuron: troubled translation?" Cell **135**(3): 401-406.

Kettenberger, H., K. J. Armache and P. Cramer (2003). "Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage." Cell **114**(3): 347-357.

Kiebler, M. A. and G. J. Bassell (2006). "Neuronal RNA granules: movers and makers." Neuron **51**(6): 685-690.

Kiriakidou, M., G. S. Tan, S. Lamprinaki, M. De Planell-Saguer, P. T. Nelson and Z. Mourelatos (2007). "An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation." Cell **129**(6): 1141-1151.

Konarska, M. M., R. A. Padgett and P. A. Sharp (1984). "Recognition of cap structure in splicing in vitro of mRNA precursors." Cell **38**(3): 731-736.

Korb, E. and S. Finkbeiner (2011). "Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior." Trends Neurosci **34**(11): 591-598.

Kramer, A. (1996). "The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing." Annu Rev Biochem **65**: 367-409.

Kramer, A., W. Keller, B. Appel and R. Luhrmann (1984). "The 5' terminus of the RNA moiety of U1 small nuclear ribonucleoprotein particles is required for the splicing of messenger RNA precursors." Cell **38**(1): 299-307.

Kruger, T., H. Zentgraf and U. Scheer (2007). "Intranucleolar sites of ribosome biogenesis defined by the localization of early binding ribosomal proteins." J Cell Biol **177**(4): 573-578.

Kula, A., J. Guerra, A. Knezevich, D. Kleva, M. P. Myers and A. Marcello (2011). "Characterization of the HIV-1 RNA associated proteome identifies Matrin 3 as a nuclear cofactor of Rev function." Retrovirology **8**: 60.

L

Langmead, B. and S. L. Salzberg (2012). "Fast gapped-read alignment with Bowtie 2." Nat Methods **9**(4): 357-359.

Lecuyer, E., H. Yoshida, N. Parthasarathy, C. Alm, T. Babak, T. Cerovina, T. R. Hughes, P. Tomancak and H. M. Krause (2007). "Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function." Cell **131**(1): 174-187.

Lee, J. W., P. C. Liao, K. C. Young, C. L. Chang, S. S. Chen, T. T. Chang, M. D. Lai and S. W. Wang (2011). "Identification of hnRNPH1, NF45, and C14orf166 as novel host interacting partners of the mature hepatitis C virus core protein." J Proteome Res **10**(10): 4522-4534.

Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin and S. Genome Project Data Processing (2009). "The Sequence Alignment/Map format and SAMtools." Bioinformatics **25**(16): 2078-2079.

Liu-Yesucevitz, L., G. J. Bassell, A. D. Gitler, A. C. Hart, E. Klann, J. D. Richter, S. T. Warren and B. Wolozin (2011). "Local RNA translation at the synapse and in disease." J Neurosci **31**(45): 16086-16093.

Lopez-Menendez, C., S. Gascon, M. Sobrado, O. G. Vidaurre, A. M. Higuero, A. Rodriguez-Pena, T. Iglesias and M. Diaz-Guerra (2009). "Kidins220/ARMS downregulation by excitotoxic activation of NMDARs reveals its involvement in neuronal survival and death pathways." J Cell Sci **122**(Pt 19): 3554-3565.

Love, M. I., W. Huber and S. Anders (2014). "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." Genome Biol **15**(12): 550.

Lucchesi, W., K. Mizuno and K. P. Giese (2011). "Novel insights into CaMKII function and regulation during memory formation." Brain Res Bull **85**(1-2): 2-8.

M

Macdonald, P. M. and G. Struhl (1988). "cis-acting sequences responsible for anterior localization of bicoid mRNA in Drosophila embryos." Nature **336**(6199): 595-598.

Makise, M., D. R. Mackay, S. Elgort, S. S. Shankaran, S. A. Adam and K. S. Ullman (2012). "The Nup153-Nup50 protein interface and its role in nuclear import." J Biol Chem **287**(46): 38515-38522.

Manley, J. L. and R. Tacke (1996). "SR proteins and splicing control." Genes Dev **10**(13): 1569-1579.

Marc, P., A. Margeot, F. Devaux, C. Blugeon, M. Corral-Debrinski and C. Jacq (2002). "Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria." EMBO Rep **3**(2): 159-164.

Marcotrigiano, J., A. C. Gingras, N. Sonenberg and S. K. Burley (1997). "Cocrystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP." Cell **89**(6): 951-961.

Miller, L. C., V. Blandford, R. McAdam, M. R. Sanchez-Carbente, F. Badeaux, L. DesGroseillers and W. S. Sossin (2009). "Combinations of DEAD box proteins distinguish distinct types of RNA: protein complexes in neurons." Mol Cell Neurosci **40**(4): 485-495.

Mollet, S., N. Cougot, A. Wilczynska, F. Dautry, M. Kress, E. Bertrand and D. Weil (2008). "Translationally repressed mRNA transiently cycles through stress granules during stress." Mol Biol Cell **19**(10): 4469-4479.

Moore, M. J. and P. A. Sharp (1993). "Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing." Nature **365**(6444): 364-368.

Morgan, D. O. (2007). *The Cell Cycle*. London, UK, New Science Press. **1**: 297.

Myasnikov, A. G., A. Simonetti, S. Marzi and B. P. Klaholz (2009). "Structure-function insights into prokaryotic and eukaryotic translation initiation." Curr Opin Struct Biol **19**(3): 300-309.

O

Oeffinger, M. and D. Zenklusen (2012). "To the pore and through the pore: a story of mRNA export kinetics." Biochim Biophys Acta **1819**(6): 494-506.

Oleynikov, Y. and R. H. Singer (2003). "Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization." Curr Biol **13**(3): 199-207.

Orphanides, G., T. Lagrange and D. Reinberg (1996). "The general transcription factors of RNA polymerase II." Genes Dev **10**(21): 2657-2683.

Ostroff, L. E., J. C. Fiala, B. Allwardt and K. M. Harris (2002). "Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices." Neuron **35**(3): 535-545.

P

Perez-Gonzalez, A., A. Rodriguez, M. Huarte, I. J. Salanueva and A. Nieto (2006). "hCLE/CGI-99, a human protein that interacts with the influenza virus polymerase, is a mRNA transcription modulator." J Mol Biol **362**(5): 887-900.

Perry, A. J., K. A. Rimmer, H. D. Mertens, R. F. Waller, T. D. Mulhern, T. Lithgow and P. R. Gooley (2008). "Structure, topology and function of the translocase of the outer membrane of mitochondria." Plant Physiol Biochem **46**(3): 265-274.

Pfanner, N. and M. Meijer (1997). "The Tom and Tim machine." Curr Biol **7**(2): R100-103.

Pinol-Roma, S. and G. Dreyfuss (1993). "hnRNP proteins: localization and transport between the nucleus and the cytoplasm." Trends Cell Biol **3**(5): 151-155.

Pleasure, S. J. and V. M. Lee (1993). "NTera 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell." J Neurosci Res **35**(6): 585-602.

Popow, J., M. Englert, S. Weitzer, A. Schleiffer, B. Mierzwa, K. Mechtler, S. Trowitzsch, C. L. Will, R. Luhrmann, D. Soll and J. Martinez (2011). "HSPC117 is the essential subunit of a human tRNA splicing ligase complex." Science **331**(6018): 760-764.

Popow, J., J. Jurkin, A. Schleiffer and J. Martinez (2014). "Analysis of orthologous groups reveals archease and DDX1 as tRNA splicing factors." Nature **511**(7507): 104-107.

R

Raker, V. A., G. Plessel and R. Luhrmann (1996). "The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro." EMBO J **15**(9): 2256-2269.

Ramaswami, M., J. P. Taylor and R. Parker (2013). "Altered ribostasis: RNA-protein granules in degenerative disorders." Cell **154**(4): 727-736.

Rappsilber, J., U. Ryder, A. I. Lamond and M. Mann (2002). "Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome." Genome Res **12**(8): 1231-1245.

Ray, A., S. Zhang, C. Rentas, K. A. Caldwell and G. A. Caldwell (2014). "RTCB-1 mediates neuroprotection via XBP-1 mRNA splicing in the unfolded protein response pathway." J Neurosci **34**(48): 16076-16085.

Reines, D., J. W. Conaway and R. C. Conaway (1996). "The RNA polymerase II general elongation factors." Trends Biochem Sci **21**(9): 351-355.

Richter, J. D. (2007). "CPEB: a life in translation." Trends Biochem Sci **32**(6): 279-285.

Robinson, J. T., H. Thorvaldsdottir, W. Winckler, M. Guttman, E. S. Lander, G. Getz and J. P. Mesirov (2011). "Integrative genomics viewer." Nat Biotechnol **29**(1): 24-26.

Rodriguez, A., A. Perez-Gonzalez and A. Nieto (2011). "Cellular human CLE/C14orf166 protein interacts with influenza virus polymerase and is required for viral replication." J Virol **85**(22): 12062-12066.

Rodriguez-Frandsen, A., R. Alfonso and A. Nieto (2015). "Influenza virus polymerase: Functions on host range, inhibition of cellular response to infection and pathogenicity." Virus Res **209**: 23-38.

Rodriguez-Frandsen, A., S. de Lucas, A. Perez-Gonzalez, M. Perez-Cidoncha, A. Roldan-Gomendio, A. Pazo, L. Marcos-Villar, S. Landeras-Bueno, J. Ortin and A. Nieto (2016). "hCLE/C14orf166, a cellular protein required for viral replication, is incorporated into influenza virus particles." Sci Rep **6**: 20744.

Roque, C. G., H. H. W. Wong, J. Q. Lin and C. E. Holt (2016). "Tumor protein Tctp regulates axon development in the embryonic visual system." Development **143**(7): 1134-1148.

Ruiz-Loredo, A. Y. and A. M. Lopez-Colome (2012). "New insights into the regulation of myosin light chain phosphorylation in retinal pigment epithelial cells." Int Rev Cell Mol Biol **293**: 85-121.

S

Sachs, A. B. and J. A. Deardorff (1992). "Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast." Cell **70**(6): 961-973.

Schou, K. B., J. S. Andersen and L. B. Pedersen (2014). "A divergent calponin homology (NN-CH) domain defines a novel family: implications for evolution of ciliary IFT complex B proteins." Bioinformatics **30**(7): 899-902.

Shaw, G. (2001, 17 Jul 2016). "A HEK293T Cell Database." Retrieved 11 Aug 2016, 2016.

Shigeoka, T., H. Jung, J. Jung, B. Turner-Bridger, J. Ohk, J. Q. Lin, P. S. Amieux and C. E. Holt (2016). "Dynamic Axonal Translation in Developing and Mature Visual Circuits." Cell **166**(1): 181-192.

Siebrasse, J. P., T. Kaminski and U. Kubitscheck (2012). "Nuclear export of single native mRNA molecules observed by light sheet fluorescence microscopy." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(24): 9426-9431.

Sonenberg, N. (2008). "eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research." Biochem Cell Biol **86**(2): 178-183.

Sonenberg, N. and A. G. Hinnebusch (2009). "Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets." Cell **136**(4): 731-745.

Sossin, W. S. and L. DesGroseillers (2006). "Intracellular trafficking of RNA in neurons." Traffic **7**(12): 1581-1589.

Spillane, M., A. Ketschek, T. T. Merianda, J. L. Twiss and G. Gallo (2013). "Mitochondria coordinate sites of axon branching through localized intra-axonal protein synthesis." Cell Rep **5**(6): 1564-1575.

Stefani, G., C. E. Fraser, J. C. Darnell and R. B. Darnell (2004). "Fragile X mental retardation protein is associated with translating polyribosomes in neuronal cells." J Neurosci **24**(33): 7272-7276.

Sutton, M. A. and E. M. Schuman (2006). "Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory." Cell **127**(1): 49-58.

T

Takebayashi, M., T. Hayashi and T. P. Su (2004). "Sigma-1 receptors potentiate epidermal growth factor signaling towards neuritogenesis in PC12 cells: potential relation to lipid raft reconstitution." Synapse **53**(2): 90-103.

Thedieck, K., B. Holzwarth, M. T. Prentzell, C. Boehlke, K. Klasener, S. Ruf, A. G. Sonntag, L. Maerz, S. N. Grellscheid, E. Kremmer, R. Nitschke, E. W. Kuehn, J. W. Jonker, A. K. Groen, M. Reth, M. N. Hall and R. Baumeister (2013). "Inhibition of mTORC1 by astrin and stress granules prevents apoptosis in cancer cells." Cell **154**(4): 859-874.

Tokunaga, K., T. Shibuya, Y. Ishihama, H. Tadakuma, M. Ide, M. Yoshida, T. Funatsu, Y. Ohshima and T. Tani (2006). "Nucleocytoplasmic transport of fluorescent mRNA in living mammalian cells: nuclear mRNA export is coupled to ongoing gene transcription." Genes Cells **11**(3): 305-317.

Tsai, N. P., J. Bi and L. N. Wei (2007). "The adaptor Grb7 links netrin-1 signaling to regulation of mRNA translation." EMBO J **26**(6): 1522-1531.

Tsai, W. C. and R. E. Lloyd (2014). "Cytoplasmic RNA Granules and Viral Infection." Annu Rev Virol **1**(1): 147-170.

V

Vaccaro, M. C., S. Gigliotti, F. Graziani, R. Carotenuto, C. De Angelis, M. Tussellino and C. Campanella (2010). "A transient asymmetric distribution of XNOA 36 mRNA and the associated spectrin network bisects *Xenopus laevis* stage I oocytes along the future A/V axis." Eur J Cell Biol **89**(7): 525-536.

Villace, P., R. M. Marion and J. Ortin (2004). "The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs." Nucleic Acids Res **32**(8): 2411-2420.

Voronina, E., G. Seydoux, P. Sassone-Corsi and I. Nagamori (2011). "RNA granules in germ cells." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(12).

W

Walsh, M. J., J. Cooper-Knock, J. E. Dodd, M. J. Stopford, S. R. Mihaylov, J. Kirby, P. J. Shaw and G. M. Hautbergue (2015). "Invited review: decoding the pathophysiological mechanisms that underlie RNA dysregulation in neurodegenerative disorders: a review of the current state of the art." Neuropathol Appl Neurobiol **41**(2): 109-134.

Wilson, R. C. and J. A. Doudna (2013). "Molecular mechanisms of RNA interference." Annu Rev Biophys **42**: 217-239.

Winkler, C. and S. Yao (2014). "The midkine family of growth factors: diverse roles in nervous system formation and maintenance." Br J Pharmacol **171**(4): 905-912.

Wolozin, B. (2012). "Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration." Mol Neurodegener **7**: 56.

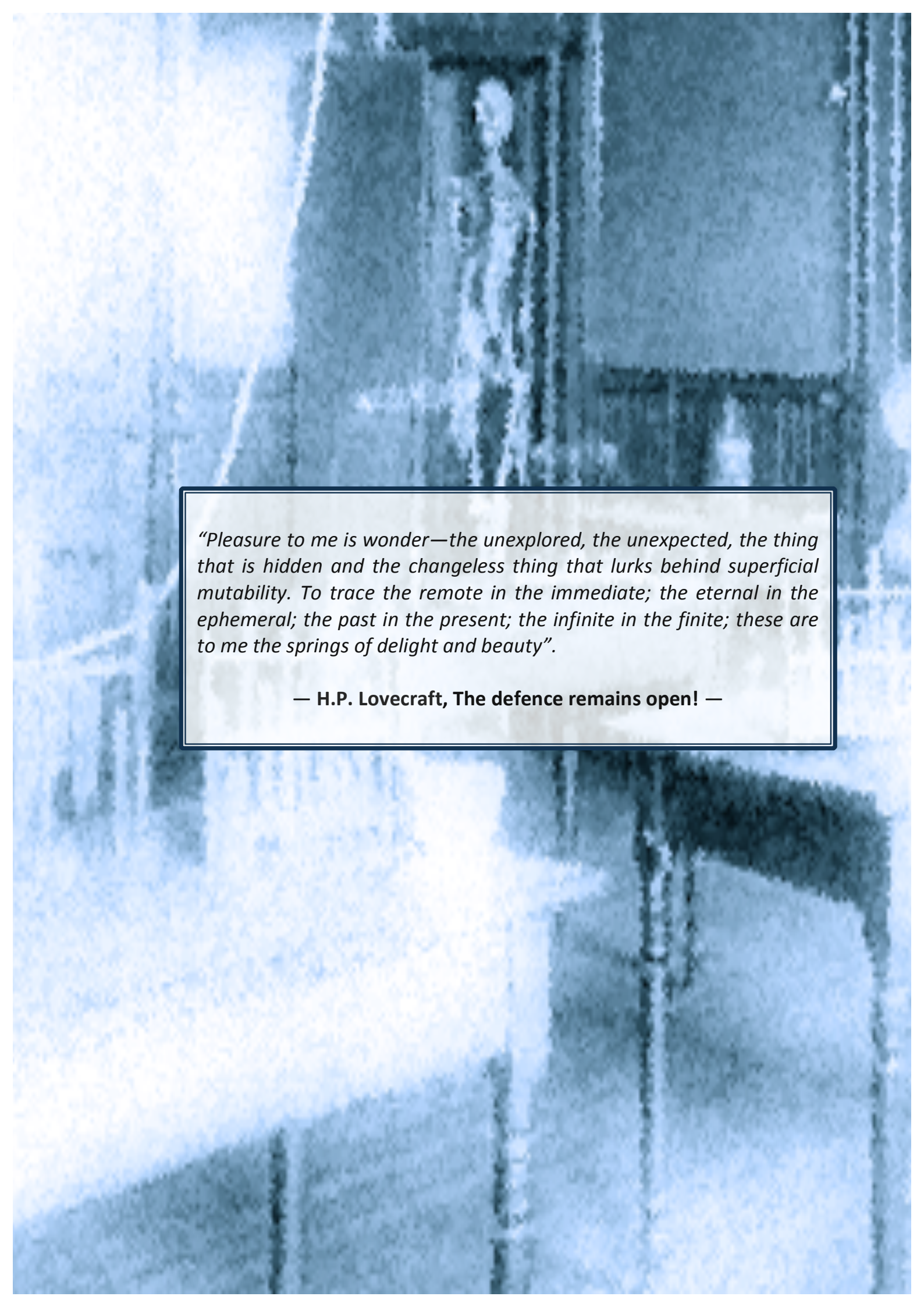
Y

Yang, L., F. Li, F. Lei, Y. Wang, S. Wu, L. Song and Y. Chen (2015). "Overexpression of chromosome 14 open reading frame 166 correlates with disease progression and poorer prognosis in human NPC." Tumour Biol **36**(10): 7977-7986.

Z

Zhang, W., J. Ou, F. Lei, T. Hou, S. Wu, C. Niu, L. Xu and Y. Zhang (2015). "C14ORF166 overexpression is associated with pelvic lymph node metastasis and poor prognosis in uterine cervical cancer." Tumour Biol.

Zipor, G., L. Haim-Vilmsky, R. Gelin-Licht, N. Gadir, C. Brocard and J. E. Gerst (2009). "Localization of mRNAs coding for peroxisomal proteins in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(47): 19848-19853.



“Pleasure to me is wonder—the unexplored, the unexpected, the thing that is hidden and the changeless thing that lurks behind superficial mutability. To trace the remote in the immediate; the eternal in the ephemeral; the past in the present; the infinite in the finite; these are to me the springs of delight and beauty”.

— H.P. Lovecraft, The defence remains open! —



ANEXOS

ANEXOS:

Artículos producto del trabajo durante la tesis:

1. *hCLE/C14orf166 is a translational activator present in neuronal RNA-transporting granules that binds cap structures differentially in distinct neuronal compartments (en revisión).*
2. hCLE/C14orf166 associates with DDX1-HSPC117-FAM98B in a novel transcription-dependent shuttling RNA-transporting complex.
3. hCLE/C14orf166, a cellular protein required for viral replication, is incorporated into influenza virus particles.
4. Influenza Virus and Chromatin: Role of the CHD1 Chromatin Remodeler in the Virus Life Cycle.

